

50
2e)



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio Bioquímico y Farmaco-
lógico del Transporte de Glicina
en las Células de Müller de la
Retina



T E S I S
Que para obtener el título de
B I O L O G A
p r e s e n t a

ANA EVA GADEA PEREZ



Director de Tesis: Dra. Ana María López Colomé

México, D. F.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Baule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
Estudio Bioquímico y Farmacológico del Transporte de Glicina en la Gifa
de Müller de la Retina
realizado por Ana Eva Gadea Pérez
con número de cuenta 9177103-4 , pasante de la carrera de Biología
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	Dra. Ana María López Colomé
Propietario	Dra. Claudia González Espinoza
Propietario	Dra. Rosalinda Guevara Guzmán
Suplente	Dr. José Ignacio Leguina Aranzamendi
Suplente	Dr. Emilio Rojas del Castillo

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Alejandro Martínez Mena
DEPARTAMENTO DE BIOLÓGICA

Dr. L. López Colomé

Decan

Emilio Rojas del Castillo

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección de la Dra. Ana María López Colomé, en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M. Se recibió apoyo del donativo CONACYT 400346-5-3375 N.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana María López Colomé por su apoyo y comentarios en la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado, Dra. Rosalinda Guevara Guzmán, Dra. Claudia González Espinoza, Dr. José Ignacio Leguina Aranzamendi y Dr. Emilio Rojas del Castillo por sus comentarios y correcciones.

A Edith por su valiosa ayuda en el trabajo de laboratorio.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	4
<i>I. LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS</i>	4
a. Morfología.....	4
b. Neurotransmisión en la retina.....	8
<i>II. LA GLÍA DEL SISTEMA NERVIOSO DE VERTEBRADOS</i>	10
a. Tipos de células gliales.....	10
b. Funciones generales.....	11
c. La glía de Müller.....	14
<i>III. TRANSPORTADORES DE NEUROTRANSMISORES</i>	19
a. Función en el sistema nervioso.....	19
b. Mecanismos de acción.....	21
c. Importancia médica.....	23
d. Transportadores de Glicina.....	25
ANTECEDENTES	33
OBJETIVO	34
MATERIALES Y MÉTODOS	34
<i>I. CULTIVO PRIMARIO DE LA GLÍA DE MÜLLER DE RETINA DE POLLO</i>	34
<i>II. ENSAYOS DE TRANSPORTE DE GLICINA</i>	35
a. Transporte de glicina a un compartimento osmóticamente sensible.....	36
b. Curva de tiempo de transporte.....	37
c. Dependencia energética del transporte.....	37
d. Efecto del pH del medio extracelular sobre el transporte.....	37
e. Especificidad del transporte.....	38
f. Cinética del transporte.....	38

g. Dependencia iónica del transporte.....	38
h. Efecto de la nigericina sobre el transporte.....	39
i. Efecto de la sarcosina sobre el transporte.....	39
<i>III. ANÁLISIS DE LA CINÉTICA DEL TRANSPORTE Y ESTADÍSTICA.....</i>	<i>40</i>
<i>IV. REACTIVOS.....</i>	<i>40</i>
RESULTADOS.....	41
<i>I. CAPTURA DE GLY EN UN COMPARTIMENTO OSMÓTICAMENTE SENSIBLE.....</i>	<i>41</i>
<i>II. CURSO TEMPORAL DEL TRANSPORTE DE GLICINA.....</i>	<i>41</i>
<i>III. DEPENDENCIA ENERGÉTICA DEL TRANSPORTE.....</i>	<i>41</i>
<i>IV. SENSIBILIDAD A LOS CAMBIOS DE PH.....</i>	<i>44</i>
<i>V. ESPECIFICIDAD DEL SISTEMA DE TRANSPORTE.....</i>	<i>46</i>
<i>VI. CINÉTICA DEL TRANSPORTE.....</i>	<i>50</i>
<i>VII. DEPENDENCIA IÓNICA DEL TRANSPORTE.....</i>	<i>50</i>
<i>VIII. EFECTO DE LA NIGERICINA SOBRE EL TRANSPORTE.....</i>	<i>55</i>
<i>IX. EFECTO DE LA SARCOSINA SOBRE EL TRANSPORTE</i>	<i>55</i>
DISCUSIÓN.....	62
CONCLUSIONES.....	76
APÉNDICE.....	77
BIBLIOGRAFÍA.....	78

RESUMEN

Las células de Müller (glía radial de la retina) presentan una disposición particular en la arquitectura de la retina de los vertebrados, atravesándola en todo su espesor (Robinson y Dreher, 1990). Los procesos de estas células se encuentran rodeando las sinapsis que establecen las neuronas en las capas plexiformes. Esta disposición, junto con la presencia de receptores a Glu así como de sistemas de transporte para el Glu y el GABA, sugiere que la glía de Müller participa activamente en los procesos de transmisión de la retina. La rápida terminación de la acción sináptica del Glu y la Gly se logra a través de su recaptura en la terminal sináptica y células gliales adyacentes. En el SNC de vertebrados, la Gly actúa como neurotransmisor inhibitorio y como modulador o coagonista del Glu en los receptores postsinápticos del tipo NMDA. Trabajos anteriores han descrito receptores del tipo NMDA en las células de Müller de la retina de pollo acoplados a la cascada de fosfoinosítidos, la entrada de calcio y la activación de la PKC (López-Colomé *et al.*, 1993) y han reportado la co-localización de los transportadores de Gly y los receptores de NMDA en cerebro (Smith *et al.*, 1992). Ya que la concentración de Gly podría participar en la modulación de la transmisión excitadora en las vías verticales de transmisión en la retina a través de los receptores de NMDA, el objetivo de este trabajo fue el de demostrar la presencia de un sistema de transporte de Gly en la glía de Müller. El estudio se realizó en cultivos confluentes de células de Müller de embriones de pollo de 7 días. Los ensayos de transporte se llevaron a cabo a 37°C en buffer Krebs-Ringer Bicarbonato que contenía Gly 1mM ([³H]-Gly/Gly 1:25000). El transporte de Gly hacia un compartimiento osmóticamente sensible llega al equilibrio a los 30 minutos. El proceso requiere de energía metabólica ya que el Iodacetato (1mM), la ouabafina (200µM) y el cianuro de potasio (1mM)

inhibieron el transporte en un 23%, 58% y 15% respectivamente; el 2,4-dinitrofenol ($50\mu\text{M}$) no tuvo efecto sobre el transporte. La sarcosina (1mM) inhibió competitivamente al transporte, mientras que la taurina, la D-serina, el GABA y la β -alanina (1mM) no tuvieron efecto. El transporte de Gly resultó ser sensible a los cambios de pH del medio extracelular; el pH óptimo para el transporte fue 7.4. El análisis cinético de la curva de saturación para la Gly en un intervalo de concentraciones de 0.01 a 2 mM ($[^3\text{H}]\text{-Gly/Gly}$ 1:5000), reveló dos sistemas de transporte: uno de baja afinidad con una K_m de $579\mu\text{M}$, V_{max} 2.3 nmol/mg de proteína en 10 minutos, y otro de alta afinidad con una K_m de $43.8\mu\text{M}$, V_{max} de 5.5 nmol/mg de proteína en 10 minutos. La dependencia iónica se estudió para ambos sistemas (reemplazando al NaCl con cloruro de colina o LiCl en el caso del Na^+ , o con Gluconato de sodio en el caso del Cl^-) y se demostró una alta dependencia por el sodio en el medio extracelular; el sistema de alta afinidad mostró también dependencia por el cloro. Estos resultados demuestran que las células de la glía de Müller presentan un sistema de transporte de Gly, por lo que podrían participar en la modulación de la transmisión excitadora en la vía vertical de la retina a través de los receptores de NMDA, al regular las concentraciones de Gly en el espacio extracelular.

ABREVIATURAS

- AIB = ácido 2-aminoisobutírico
ALS = esclerosis amiotrófica lateral
AMPA = α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato
Asp = aspartato
ATP = adenosin trifosfato
Ci = curie, unidad de radioactividad
DIV = días *in vitro*
DNP = dinitrofenol
GABA = ácido γ -amino butírico
GFAP = proteína ácida fibrilar glial
Gly = glicina
[³H]-Gly = glicina tritiada
Glu = glutamato
HEPES = ácido N(2-hidroxietil)piperazin-N'-(2-etanosulfónico)
KA = kainato
KCN = cianuro de potasio
 K_m = constante de afinidad
KRB = Krebs Ringer Bicarbonato
MeAIB = ácido 2-(metilamino)isobutírico
NMDA = N-metil-D-aspartato
PKC = proteína cinasa C
SNC = sistema nervioso central
Tris = Tris(hidroxi-metil)amino metano
 V_{max} = velocidad máxima

INTRODUCCIÓN

I. LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS

a. Morfología

La retina es una capa delgada de tejido nervioso localizada en la parte posterior del ojo, donde se lleva a cabo la recepción de los estímulos visuales y los primeros pasos del procesamiento de información de la vía visual (Shepherd, 1974). La organización laminar y el número limitado de tipos celulares que presenta facilitan la identificación y localización de distintas funciones bioquímicas y fisiológicas. En este sentido, la retina de los vertebrados ha sido considerada un buen modelo para estudiar al sistema nervioso central (SNC) (Farber y Adler, 1986). La retina de las aves es un modelo que ofrece grandes ventajas: en primer lugar, contiene un sólo tipo de células gliales, las células de Müller. En segundo lugar y al contrario de la retina de los mamíferos, la de las aves es avascular y, por lo tanto, su análisis bioquímico no se complica por la presencia de células endoteliales y elementos sanguíneos. En tercer lugar, las retinas de embriones de pollo de edad temprana pueden continuar su desarrollo *in vitro* bajo condiciones de cultivo relativamente simples. Y por último, el tejido de la retina de las aves puede ser fácilmente disociado en una suspensión de células para luego formar cultivos adherentes en monocapa y así obtenerse en etapas definidas del desarrollo (Moscona, 1983).

La retina de vertebrados está constituida por tres tipos celulares básicos: neuronas, células del epitelio pigmentado y células gliales (Wheater *et al.*, 1987). Dentro de las neuronas hay 5 tipos distintos: los fotorreceptores (conos y bastones), las células bipolares, las células horizontales, las células amacrinas y las células ganglionares; y dentro de las células gliales hay dos tipos: las células

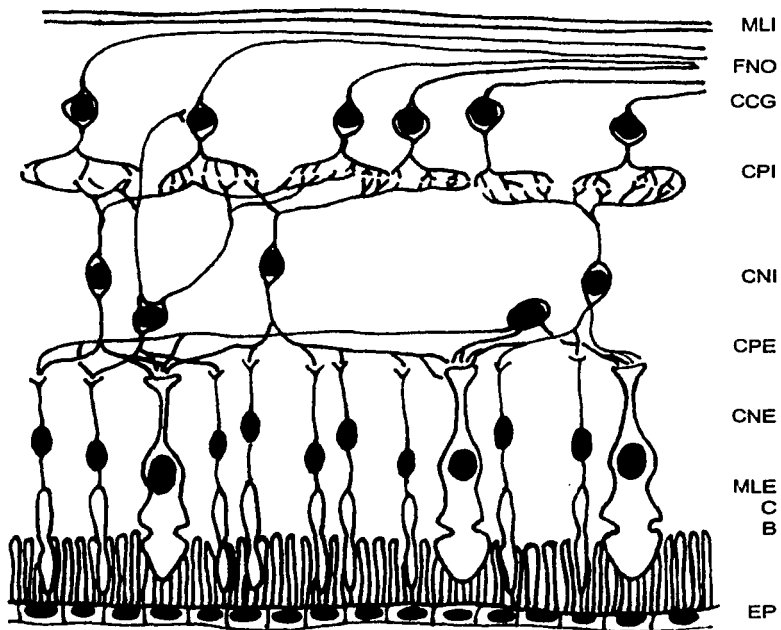


Figura 1. Diagrama de las capas de la retina de los vertebrados y sus relaciones sinápticas. EP, epitelio pigmentado; B, bastones; C, conos; MLE, membrana limitante externa; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de células ganglionares; FNO, fibras del nervio óptico; MLI, membrana limitante interna (Wheater *et al.*, 1987).

de Müller y los astrocitos (Newman, 1985).

Histológicamente, la retina de vertebrados se divide en varias capas distintas (Fig. 1). La capa más externa se encuentra formada por las células del epitelio pigmentado organizadas en una monocapa que descansa sobre la membrana de Bruch y que separa al resto de la retina de los capilares sanguíneos coroides. La segunda capa comprende a los segmentos externo e interno de conos y bastones y a una estructura delgada conocida como la membrana limitante externa, constituida por las uniones entre las células de Müller y que los separa de la siguiente capa: la nuclear externa, formada por los cuerpos celulares de los fotorreceptores (Wheater *et al*, 1987). A ésta le sigue la capa plexiforme externa, en la que se establecen sinapsis entre fotorreceptores, células bipolares y células horizontales, seguida de la capa nuclear interna donde se encuentran los cuerpos neuronales de las células horizontales, bipolares y amacrinas. Después se encuentra la capa plexiforme interna donde se establecen sinapsis entre células bipolares, amacrinas y ganglionares; y por último, la capa de células ganglionares cuyas fibras aferentes convergen en un punto para formar el nervio óptico (Dowling, 1970). Funcionalmente la retina de los vertebrados se divide en retina externa (fotorreceptores y capa plexiforme externa) y retina interna (capa nuclear externa y siguientes).

Atendiendo a su morfología, el segmento externo de los bastones es cilíndrico, mientras que el de los conos es, como su nombre lo dice, cónico. Ambos tipos de segmento externo contienen una serie de discos membranosos apilados que incorporan en sus membranas las moléculas de pigmento encargadas de absorber la luz (Schnapf y Baylor, 1987) (Fig. 2). En el caso de los bastones este pigmento es la rodopsina, que absorbe la luz a una longitud de

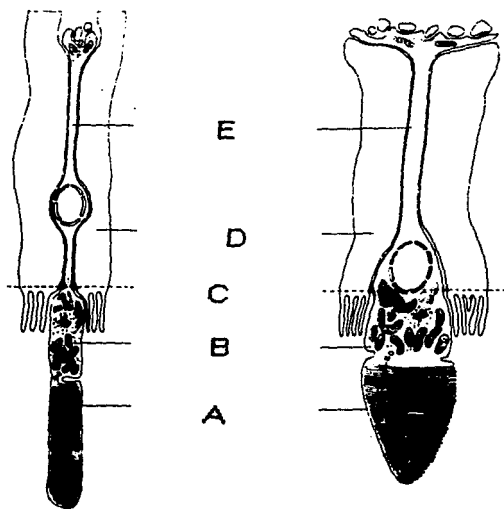


Figura 2. Diagrama esquemático de los fotorreceptores. A la derecha se muestra un cono, a la izquierda un bastón. Tanto los conos como los bastones consisten de un segmento externo (A) y uno interno (B) conectados por un puente cilíar. El segmento interno de ambos tipos celulares contiene al núcleo y la mayor parte de la maquinaria biosintética y se continúa con la terminal de la célula fotorreceptora o axón (E), la cual forma sinapsis con los siguientes elementos neuronales de la retina. El segmento externo contiene un sistema de discos membranosos apilados que se forman a partir de invaginaciones de la membrana plasmática y que contienen a los pigmentos visuales. C, membrana limitante externa; D, célula de Müller (Wheater *et al.*, 1987).

onda de 500 nm y están especializados para la recepción de luz tenue. Los conos contienen los pigmentos específicos para la visión en color y están especializados para la recepción de luz brillante (Shepherd, 1974).

Las células bipolares, en general, hacen conexiones directas entre uno o más fotorreceptores y una o más células ganglionares, transmitiendo en sentido vertical la información visual. Las células horizontales presentan varios procesos cortos, y uno más delgado y largo que los demás al cual se le considera como axón. Estos procesos conectan lateralmente, en la capa plexiforme externa, a conos y bastones ya sea contiguos o más lejanos. Las células amacrinas poseen uno o dos árboles dendríticos que dan lugar a numerosas ramas, las cuales hacen conexión con células bipolares y células ganglionares en la capa plexiforme interna y, en ocasiones, con fotorreceptores en la capa plexiforme externa (Wheater *et al*, 1987).

Las células de la glía de Müller son de gran tamaño y atraviesan prácticamente toda la retina, extendiéndose desde la membrana limitante interna hasta los fotorreceptores (Farber y Adler, 1986). Su núcleo se encuentra en la capa nuclear interna y a través de largos procesos citoplásmicos rodea a las neuronas, llenando así los espacios intercelulares (Wheater *et al*, 1987).

b. Neurotransmisión en la retina

Estudios farmacológicos y registros electrofisiológicos intracelulares han proporcionado pruebas de que los aminoácidos excitadores son importantes neurotransmisores en la retina de vertebrados. Estos estudios sugieren que los fotorreceptores, las células bipolares y algunas células amacrinas utilizan glutamato o aspartato como neurotransmisor, de manera que la vía vertical de la

retina que va de los fotorreceptores a las células bipolares y de éstas a las células ganglionares es excitadora (Miller y Slaughter, 1885).

Las altas concentraciones de la enzima aspartato aminotransferasa, enzima que sintetiza aspartato y glutamato, presentes en fotorreceptores, células bipolares y algunas amacrinas; así como la presencia de sistemas de transporte de alta afinidad para estos aminoácidos, son otro tipo de evidencia que apoya la idea de que los aminoácidos excitadores son los transmisores endógenos en la vía vertical de la retina (Iuvone, 1986).

Los dos principales neurotransmisores inhibidores son el ácido γ aminobutírico (GABA) y la Gly. Las células horizontales y las amacrinas llevan a cabo el procesamiento lateral de información en las capas plexiforme externa e interna, respectivamente. En todos los vertebrados, el GABA y la Gly se localizan en algunas células amacrinas, y en vertebrados inferiores, el GABA se localiza también en algunas células horizontales (Daw *et al.*, 1989).

La Gly está presente en la retina de vertebrados a concentraciones muy similares a las encontradas en el SNC (Pasantés-Morales *et al.*, 1972). Las concentraciones más altas de Gly dentro de la retina se han encontrado en la capa plexiforme interna, en la capa de células ganglionares y en las células amacrinas. La $[^3\text{H}]$ Gly se acumula en la retina por sistemas de transporte de alta afinidad y los estudios autorradiográficos han indicado que ésta se concentra principalmente en las células amacrinas (Iuvone, 1986). Además, se ha demostrado la liberación de Gly, tanto acumulada como endógena, estimulada por potasio y dependiente de Ca^{2+} en la retina (López-Colomé *et al.*, 1978).

Dentro de las catecolaminas, la dopamina es la que se encuentra principalmente en la retina de los vertebrados, predominantemente en una subclase de células amacrinas y se le ha atribuido una función

neuromoduladora. En la mayoría de los vertebrados, otra subclase de células amacrinas utilizan a la acetilcolina (ACh) como neurotransmisor.

II. LA GLÍA DEL SISTEMA NERVIOSO DE VERTEBRADOS

a. Tipos de Células Gliales

La mayoría de las neuronas en el sistema nervioso se encuentran rodeadas por células satélite. Estas células satélite fueron descritas por primera vez en 1846 por Rudolf Virchow, quien las llamó *neuro-glia* (del griego *glia*, "pegamento"). Se calcula que las células gliales son entre 10 y 50 veces más numerosas que las neuronas en el sistema nervioso de vertebrados (Nicholls *et al.*, 1992).

La neuroglía del sistema nervioso de vertebrados se ha dividido en dos grandes clases: la microglía y la macroglía. La microglía está formada por células fagocíticas que se mobilizan después de una lesión o infección y son de origen mesodérmico. La macroglía son células de origen ectodérmico y se divide en tres grupos: los oligodendrocitos, las células de Schwann y los astrocitos.

Los oligodendrocitos y las células de Schwann son células pequeñas con pocos procesos y se encargan de formar la vaina de mielina alrededor de los axones de las neuronas. Esta vaina de mielina aísla eléctricamente a los axones, de manera que se incrementa la conducción de las señales eléctricas. Los oligodendrocitos se encuentran en el sistema nervioso central y pueden envolver a varios axones, mientras que las células de Schwann son exclusivas del sistema nervioso periférico y envuelven a un sólo axón.

Los astrocitos son el más abundante de los tres grupos que comprende la macroglía, sus cuerpos celulares son irregulares y presentan largos procesos. Una de las funciones que se les ha atribuido es la de intervenir en la formación de la barrera hematoencefálica, pues al hacer contacto con los vasos sanguíneos provocan la formación de uniones estrechas entre las células endoteliales que impiden el paso de sustancias tóxicas de la sangre al cerebro. Algunos astrocitos presentan pies terminales que hacen contacto con neuronas y vasos sanguíneos, lo que ha hecho pensar que también tienen la función de nutrir a las neuronas. Por otro lado, parece ser que, al igual que la microglía, eliminan los restos neuronales y ayudan a sellar el tejido nervioso dañado después de una lesión. Por último, el potencial de reposo de los astrocitos está determinado por su alta permeabilidad al K^+ . Como resultado, los astrocitos recapturan y amortiguan el exceso de K^+ liberado por las neuronas cuando su actividad es alta, protegiéndolas así de la despolarización que resultaría de la acumulación de K^+ en el espacio extracelular (Kandel *et al.*, 1991).

De un tipo de astrocitos deriva la glía radial, la cual se caracteriza por presentar una forma alargada y por extenderse en la pared cerebral durante el desarrollo formando filamentos alargados sobre los cuales las neuronas en desarrollo migran hacia su destino final (Nicholls *et al.*, 1992). Dentro de la glía radial se incluyen a las células ependimales, a las células gliales de Bergmann en el cerebelo y a las células de Müller en la retina (Bartlett *et al.*, 1981).

b. Funciones Generales

Hallazgos recientes indican que las células gliales, aunque no son capaces de generar potenciales de acción debido a que su potencial de

membrana es muy electronegativo, realizan muchas más funciones de las que se pensaba hace tiempo y que modulan la actividad neuronal. Por medio de registros intracelulares se observó que los potenciales de reposo de las células gliales eran mucho mayores que los de las neuronas a las que rodeaban (Barres, 1991). En vertebrados, los potenciales de membrana más altos registrados en neuronas oscilan entre -70 y -75 mV, mientras que los valores para las células gliales se acercan a los -90 mV. Este potencial de reposo de las células gliales está determinado por el potencial de equilibrio del K^+ , ya que presentan una alta permeabilidad a estos iones, al mismo tiempo que presentan una baja permeabilidad por los iones Na^+ y Ca^{2+} (Nicholls *et al.*, 1992). Como consecuencia de la actividad neuronal prolongada, la concentración de K^+ en el espacio periaxónal aumenta de dos a cinco veces; un incremento de esta magnitud influye de manera considerable sobre el potencial de membrana y propiedades metabólicas de las células gliales así como sobre las respuestas neuronales: alterando por ejemplo la cantidad de neurotransmisor liberado por las neuronas presinápticas, modulando las interacciones neuronales recíprocas, o afectando el umbral de activación de las células postsinápticas. Las concentraciones de K^+ iniciales (pre-estímulo) deben de ser restablecidas para que un segundo impulso nervioso pueda llevarse a cabo (Ripps y Witkovsky, 1983). Se ha propuesto entonces que las células gliales regulan la concentración de K^+ del medio extracelular gracias a su alta conductancia para este ión, capturándolo en las regiones con una alta concentración y liberándolo en regiones distales donde su concentración es menor (Orkand 1966).

Se ha encontrado que las células gliales presentan sistemas de recaptura de neurotransmisores y, ya que las sinapsis se encuentran por lo general encapsuladas por los procesos de las células gliales, se ha propuesto que juegan un papel importante en la terminación de la transmisión. También se ha

pensado que funcionan proporcionando aislamiento a las sinapsis ya que evitan que el neurotransmisor se esparza a sinapsis cercanas. Entre los sistemas de transporte que se han localizado en las células gliales está el de Glu, en el cual el transporte se ve acompañado de dos iones Na^+ al mismo tiempo que se transportan en sentido contrario un ión K^+ y un grupo OH^- o bien un HCO_3^- . Por lo tanto, la captura de Glu provoca la alcalinización del medio extracelular, de manera que las células gliales pueden regular los cambios extracelulares de pH inducidos por la actividad neural (Bouvier *et al.*, 1992). Otra consecuencia de la captura de Glu por las células gliales es que mantiene bajos los niveles de Glu en el medio extracelular. De acuerdo con la hipótesis de la excitotoxicidad, un exceso en la liberación de Glu resulta en la degeneración de varias poblaciones neuronales en el sistema nervioso central, como ocurre por ejemplo en la isquemia y en la hipoxia (Siliprandi *et al.*, 1992).

La glía presenta una enzima característica, la glutamina sintetasa, que cataliza la aminación de glutamato en glutamina, precursor de varias vías biosintéticas, como de la síntesis de los neurotransmisores Glu y GABA. Otra enzima característica de las células gliales es la anhidrasa carbónica, la cual cataliza la hidratación del dióxido de carbono y por lo tanto está involucrada en las funciones respiratorias vitales. Esta enzima también participa en la regulación del movimiento iónico y el balance de fluidos, por lo que juega un papel importante en la homeostasis y, como influencia los equilibrios de Na^+ y K^+ , afecta indirectamente la actividad neuronal (Moscona, 1983).

Las células gliales en cultivo son capaces de responder a numerosos neurotransmisores con cambios en el potencial de membrana. Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que estos cambios son mediados por los receptores a neurotransmisores presentes en las células gliales. Se han encontrado receptores para Glu y GABA en astrocitos *in vitro*, con

características similares a los encontrados en neuronas. Los astrocitos en cultivo también expresan receptores para neurotransmisores que activan sistemas de señales intracelulares como son: el incremento de las concentraciones intracelulares de diacil glicerol, fosfatos de inositol, Ca^{2+} , AMPc y GMPc; los cuales a su vez pueden modular la actividad de canales iónicos y enzimas (Barres, 1991). En las células de Müller de la retina se ha demostrado la estimulación de la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) por la activación de receptores a aminoácidos excitadores (López-Colomé *et al.*, 1993). La presencia de receptores para neurotransmisores en la glía sugiere que debe de ocurrir una señalización entre neuronas y glía a través de neurotransmisores.

Las células gliales también sintetizan y, en ocasiones, liberan neurotransmisores como las células de Schwann del axón gigante de calamar que normalmente sintetizan y liberan acetilcolina (Heumann *et al.*, 1981). Las células gliales no contienen vesículas sinápticas, pero se ha sugerido que la liberación de neurotransmisores se lleva a cabo a través de la operación en reversa de las proteínas transportadoras de neurotransmisores que normalmente funcionan capturándolos (Amara y Kuhar, 1993).

Ya que las células gliales presentan un alto grado de plasticidad en respuesta a las señales neuronales, cambios a largo plazo en las propiedades de la membrana de las células gliales podrán mediar cambios a largo plazo en la función sináptica (Barres, 1991).

c. La Glía de Müller

En la retina de vertebrados se han identificado dos tipos de células gliales: las células de Müller y los astrocitos, estas últimas presentes sólo en

retinas vascularizadas (Rasmussen, 1974). En la retina de las aves, las células de Müller son el único tipo de gliocito presente y, por lo tanto, combinan funciones que en otras partes del sistema nervioso están compartimentalizadas en diversos tipos de células gliales (Moscona, 1983).

Las células de Müller de la retina de los vertebrados son células orientadas radialmente que se extienden a todo lo largo de la retina, desde la capa de fibras del nervio óptico hasta el nivel de los segmentos internos de los fotorreceptores (Fig. 4). El pie terminal de la célula de Müller es una expansión cónica que termina en la membrana limitante interna de la retina, la cual está formada por fibras de colágeno y glicoproteínas a las cuales se adhieren las células de Müller. El tronco principal pasa verticalmente a través de la capa de fibras ópticas, de la capa de células ganglionares y de la capa plexiforme interna hasta llegar a la capa nuclear interna, donde se localiza el núcleo de la célula de Müller, por lo que a este nivel se observa un ensanchamiento del tronco principal. Los procesos laterales que salen del tronco principal forman una matriz que rodea al pericarion de las células ganglionares. Distal al núcleo, al llegar a la membrana limitante externa, la célula de Müller forma una serie de microvellosidades que penetran entre los cuerpos de los fotorreceptores al espacio subretinal. A estas estructuras se les ha llamado canastas de Schultze y contribuyen a la formación de la membrana limitante externa. En las capas plexiformes, las células de Müller emiten numerosas ramificaciones horizontales que por lo general están íntimamente asociadas a dendritas neuronales y sinapsis. En la capa nuclear interna, las células de Müller envuelven parcialmente a las neuronas adyacentes, mientras que en la capa nuclear externa y en la capa de células ganglionares las envuelven totalmente (Robinson y Dreher, 1990).

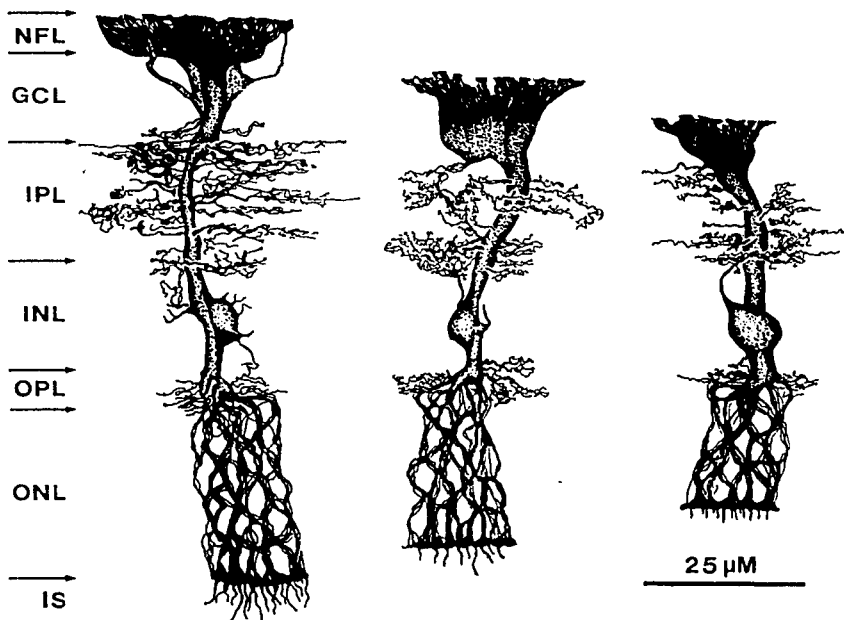


Figura 4. Dibujos en cámara lúcida de células de Müller y su ubicación respecto a las diferentes capas de la retina. NFL, capa de fibras nerviosas; GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa; IS, segmento interno del fotorreceptor (Robinson y Dreher, 1990).

Con base en estudios citoquímicos y estructurales Magalhaes y Coimbra (1972) dividieron a las células de Müller en tres zonas: (1) la porción interna de la célula, que se extiende desde la membrana limitante interna hasta el límite entre las capas plexiforme interna y nuclear interna, que contiene principalmente microfilamentos, retículo endoplásmico liso así como una gran cantidad de gránulos de glucógeno; (2) la porción media de la célula, que ocupa la capa nuclear interna y contiene al núcleo, así como retículo endoplásmico rugoso abundante y el aparato de Golgi; y (3) la porción externa de la célula que se extiende hasta la capa de fotorreceptores y se caracteriza por presentar numerosos microtúbulos y mitocondrias. Por estas características se concluyó que la porción interna de la célula es responsable de la síntesis, almacenamiento y liberación de glucógeno; la porción media se encarga de la síntesis y transporte de proteínas estructurales y de secreción; y la porción externa está especializada en la absorción y en el transporte intracelular activo.

Las células de Müller parecen tener un papel importante en el desarrollo. Son de las primeras células retinales en nacer y, ya que se extienden a todo lo grueso de la retina y están en contacto directo con la mayoría de las neuronas en desarrollo, es muy probable que estén involucradas en la inducción y en la organización de las capas nucleares y plexiformes (Moscona, 1983).

No se aprecian diferencias morfológicas significativas entre células de Müller de retinas vascularizadas y avasculares (Rasmussen, 1974). El potencial de membrana también varía muy poco de una especie a otra y es de alrededor de -80 mV. Este potencial de membrana está dado por la concentración externa de K^+ , ya que las células de Müller son altamente permeables a este ión. La conductancia al K^+ no es uniforme en toda la célula. El exceso de K^+ producido por la actividad de las neuronas retinales es capturado por estas células y la salida de este ión ocurre en la región de la célula donde se presente la mayor

conductancia a éste. En especies con retinas vascularizadas, la conductancia es mayor en la porción de la célula que corresponde a la capa nuclear interna. En esta misma región, los capilares rodean a los procesos de las células de Müller, por lo que se propone que en esta zona se libera el K^+ hacia los vasos sanguíneos. En especies con retinas avascularizadas, la mayor conductancia se presenta en el pie terminal de las células, por lo que el exceso de K^+ es liberado al humor vítreo (Newman, 1987).

Las células de Müller presentan sistemas de transporte de alta afinidad dependientes de Na^+ para aminoácidos neurotransmisores. En estas células se ha demostrado la presencia de un sistema de transporte para el GABA (Graham, 1972). El L-Glu, L-Asp y el D-Asp comparten un sistema de transporte de alta afinidad, también dependiente de Na^+ . Este sistema ha sido caracterizado en cultivos primarios de glía de Müller (Somohano y López-Colomé, 1991). Este sistema de transporte es capaz de liberar Glu si se elevan las concentraciones de K^+ extracelulares, pues el transportador funciona expulsando K^+ al mismo tiempo que captura Glu y Na^+ . Al elevar las concentraciones de K^+ extracelulares el transporte se revierte, liberándose Glu (Szatkowsky *et al.*, 1990). Se ha propuesto entonces que las células de Müller juegan un papel importante en el control de los niveles extracelulares de estos neurotransmisores. Además, las células de Müller presentan sistemas enzimáticos para la conversión o degradación de estas sustancias como la glutamina sintetasa, la GABA transaminasa (GABA-T) y la deshidrogenasa de semialdehído succínico (SSA) (Ripps y Witkovsky, 1985).

III. TRANSPORTADORES DE NEUROTRANSMISORES

a. Función en el Sistema Nervioso

Una de las principales funciones que desempeñan los sistemas transportadores de neurotransmisores es la de terminar la transmisión sináptica. La neurotransmisión química se lleva a cabo en cuatro pasos: (1) la síntesis del neurotransmisor, (2) el almacenamiento y liberación de este neurotransmisor por parte de la terminal sináptica, (3) la interacción del neurotransmisor con sus receptores en la membrana postsináptica y, (4) la eliminación del neurotransmisor del espacio sináptico. La eliminación del transmisor liberado es crítica para que termine la transmisión sináptica. Si el transmisor liberado persistiera en el espacio sináptico, una nueva señal no podría tener lugar ya que los receptores se encontrarían desensibilizados. Existen tres mecanismos por medio de los cuales se termina la acción del transmisor liberado: la *difusión* del neurotransmisor hacia afuera del espacio sináptico a través del fluido extraneuronal; la *degradación enzimática* del neurotransmisor, mecanismo utilizado principalmente por el sistema colinérgico; y la *recaptura* del neurotransmisor por medio de moléculas transportadoras o acarreadoras, específicas para cada transmisor y presentes tanto en la membrana de la neurona presináptica como en la membrana de las células gliales que se encuentran rodeando a la sinapsis (Kanner, 1994).

Los transportadores de neurotransmisores dependientes de sodio son el principal medio por el cual se inactiva al neurotransmisor en el espacio sináptico (Nelson y Lill, 1994). Estos acarreadores transportan al neurotransmisor a través de la membrana plasmática de las células neuronales y gliales vecinas junto con

iones Na^+ . Típicamente, la concentración de iones K^+ en el interior de las neuronas y células gliales es mayor que la concentración extracelular de este ión, mientras que la concentración intracelular de iones Na^+ es menor que la extracelular. El co-transporte de un neurotransmisor con iones Na^+ a favor del gradiente electroquímico de este ión (hacia adentro de la célula), proporciona la energía necesaria para conducir al neurotransmisor hacia el interior de la célula, en contra de su gradiente de concentración (Kanner, 1994).

La inactivación rápida del neurotransmisor liberado por su recaptura en la terminal sináptica o células gliales, es un mecanismo más eficiente para terminar la transmisión que el de la simple difusión del transmisor lejos del sitio de liberación. Evitar la difusión del neurotransmisor lejos de la sinapsis donde fue liberado, minimiza el riesgo de que el neurotransmisor actúe sobre sinapsis adyacentes (Uhl y Johnson, 1994).

La recaptura de muchos neurotransmisores en la terminal nerviosa y luego en los compartimentos vesiculares permite el reciclaje, es decir, que las mismas moléculas de neurotransmisor sean utilizadas otra vez, lo que trae consigo un ahorro en costos sintéticos (Jursky *et al.*, 1994). Estudios recientes han demostrado que los transportadores de neurotransmisores, en ciertas condiciones tanto fisiológicas como patológicas, pueden funcionar en sentido inverso, llevando a cabo la liberación no vesicular, independiente de Ca^{2+} , del neurotransmisor (Attwell *et al.*, 1993).

Ya que los transportadores localizados en las membranas plasmáticas de las células neuronales y gliales regulan las concentraciones locales de neurotransmisor, es evidente que juegan un papel importante en la modulación de la actividad de los receptores. También se ha sugerido que participan en otras funciones como detoxificación, protección de sustancias reactivas y nutrición (Jursky *et al.*, 1994).

b. Mecanismos de Acción

La energía necesaria para el ciclo de la neurotransmisión la proporcionan dos ATPasas distintas. Las vesículas sinápticas contienen una ATPasa de H⁺ vacuolar que proporciona la fuerza protonmotriz para la acumulación de los neurotransmisores en las vesículas (Nelson, 1992). La membrana plasmática de las células neuronales y gliales presenta una ATPasa de Na⁺/K⁺ que genera gradientes electroquímicos de sodio y potasio (expulsando 3Na⁺ e incorporando 2K⁺), de manera que la concentración de sodio extracelular es mayor que la intracelular y la concentración de potasio extracelular es menor que la intracelular. La actividad de los transportadores presentes en la membrana plasmática es conducida por el gradiente de sodio, por el gradiente de potasio o por ambos. Aunque la fuerza motriz principal es el gradiente de sodio generado por esta ATPasa Na⁺/K⁺, hay variantes. Los transportadores de Glu co-transportan dos iones Na⁺ con cada molécula de Glu, al mismo tiempo que contra-transportan un ión K⁺ y un ión OH⁻ hacia afuera de la célula. Los transportadores de Gly y GABA co-transportan dos iones Na⁺ y un ión Cl⁻ por cada molécula de transmisor, hacia el interior de la célula (la concentración extracelular de Cl⁻ también es mayor que la intracelular) (Fig. 5). Por medio de la utilización diferencial de estas fuerzas, el transportador puede ser controlado y actuar de manera específica en cada espacio sináptico o célula glial en que esté presente (Nelson y Lill, 1994).

La afinidad de los transportadores de neurotransmisores por sus sustratos es, por lo general, más baja que la afinidad de los receptores por los transmisores correspondientes. La distribución general de la actividad del transporte concuerda con la distribución de los transmisores liberados, lo que sugiere que los transportadores son expresados de manera específica para cada sistema de neurotransmisión (Uhl y Hartig, 1992).

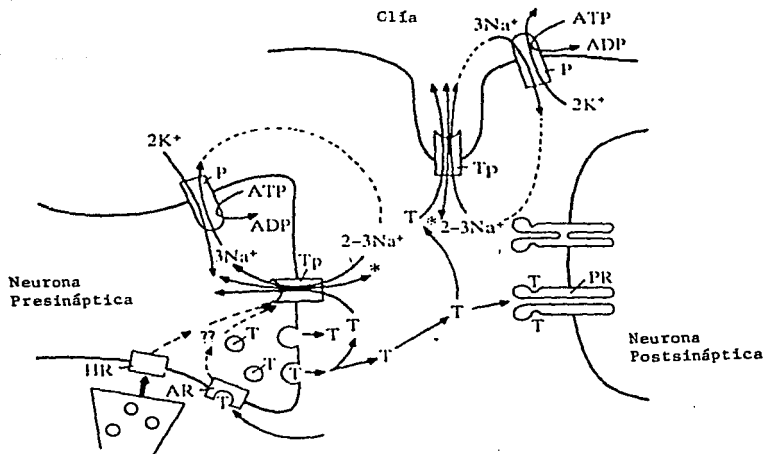


Figura 5. Mecanismos de acción de los transportadores de neurotransmisores. El neurotransmisor (T) que se encuentra almacenado en las vesículas sinápticas, se libera al espacio sináptico al fusionarse éstas con la membrana plasmática presináptica. Después de su difusión a través del espacio sináptico, el transmisor se une a receptores postsinápticos (PR) específicos que pueden ser ionotrópicos o metabotrópicos. Posteriormente, el transmisor debe de ser eliminado del espacio sináptico para que pueda tener lugar un segundo impulso. Los transportadores de neurotransmisores (Tp) recapturan al transmisor hacia la terminal sináptica o hacia las células gliales vecinas junto con Na^+ y otros iones (*). En el caso de los transportadores de Gly y otros, * es cloro, que se mueve en la misma dirección que el sodio y el neurotransmisor. En el caso de los transportadores de Glu, * representa al potasio, que se mueve en dirección opuesta al sodio y al Glu. La fuerza motriz para este proceso es el gradiente electroquímico de los iones sodio, que se mantiene por la ATPasa Na^+/K^+ . La regulación fisiológica de los transportadores tal vez se de a través de receptores para el mismo neurotransmisor (autorreceptores, AR) o para otros (heterorreceptores, HR) (Kanner, 1994).

c. Importancia Médica

Los transportadores de neurotransmisores tienen una gran importancia médica, debido a que regulan la actividad de los neurotransmisores eliminándolos del espacio sináptico. Ciertos inhibidores específicos de estos transportadores son utilizados como drogas para tratar diversos padecimientos neurológicos. Por ejemplo, si se disminuye la recaptura de GABA, el efecto de éste se verá prolongado. Por lo tanto, ciertos inhibidores del transporte de GABA podrían representar una nueva clase de drogas antiepilépticas (Kanner, 1994). Por otro lado, los transportadores son blancos moleculares de ciertos psicoestimulantes, como la cocaína que se une al transportador de dopamina inhibiendo su recaptura (Kuhar *et al.*, 1991); y de antidepresivos, como el Prozac, que inhibe la recaptura de serotonina (Barondes, 1994).

La actividad excesiva de redes neuronales que utilizan aminoácidos excitadores como neurotransmisores que se presenta en ciertos estados patológicos lleva a la neurodegeneración en varios sistemas. Una de las principales funciones de los transportadores de Glu en el sistema nervioso es la de evitar que la concentración de Glu extracelular se eleve a niveles neurotóxicos. Si la concentración se eleva por arriba de 100 μM por más de unos minutos sobreviene la muerte neuronal, pues este nivel de Glu produce el flujo excesivo de Ca^{2+} y de sodio hacia el interior de la célula a través del receptor de NMDA, así como la difusión pasiva concomitante de agua y cloro (Boje *et al.*, 1992). La anoxia o la isquemia cerebrales que se presentan en la asfixia neonatal o en el infarto cerebral, ocasionan una disminución en los niveles de ATP; esto a su vez ocasiona un desbalance en la concentración de los gradientes iónicos (que mantienen las ATPasas), la liberación masiva de Glu al espacio extracelular a través del transportador de Glu y, finalmente, la muerte

neuronal (Attwell *et al.*, 1993). La incapacidad de los transportadores gliales o neuronales de recapturar adecuadamente el Glu liberado o endógeno de las vecindades de los receptores, donde puede ejercer una fuerte influencia excitadora a través de los receptores de NMDA, contribuye sustancialmente a la epileptogénesis a corto plazo y a la excitotoxicidad a largo plazo que ocasiona la muerte celular (Uhl y Johnson, 1994).

Los transportadores de Gly podrían participar también en la excitotoxicidad producida por el Glu a través de los receptores de NMDA, ya que la Gly actúa como coagonista potenciando el efecto del Glu sobre estos receptores (Smith *et al.*, 1992). Se ha comprobado que la Gly potencia la muerte neuronal excitotóxica producida por la activación crónica del receptor de NMDA por NMDA (McNamara y Dingledine, 1988) y ácido quinolínic (Swartz *et al.*, 1988) en neuronas corticales y estriatales, respectivamente. La capacidad del 7-clorokinurenato (antagonista del sitio de la glicina en el receptor de NMDA) de reducir la neurotoxicidad del Glu en cultivos celulares, pone en evidencia el potencial de la Gly en estados patológicos. En ciertas etapas de las enfermedades neurodegenerativas se presenta una pérdida de receptores de NMDA, por lo que la transmisión es subóptima. Se ha propuesto que el elevar los niveles de Gly endógena, tal vez disminuyendo el transporte de ésta, podría resultar benéfico por incrementar la transmisión a través de los receptores de NMDA (Fletcher *et al.*, 1990). En la esclerosis amiotrófica lateral (ALS), caracterizada por la pérdida de neuronas motoras en la médula espinal y tallo cerebral, y de células piramidales en la corteza motora, se presenta una disminución tanto en el transporte de Glu como en el transporte de Gly, registrándose altos niveles de estos aminoácidos en el fluido cerebroespinal. La sensibilidad de las neuronas motoras a altas concentraciones de Glu y Gly

podría explicar la selectiva vulnerabilidad de esta población celular en ALS (Virgo y Belleruche, 1995).

d. Transportadores de Gly

Los transportadores de neurotransmisores han sido clasificados en tres familias distintas: (1) transportadores dependientes de sodio y cloro que operan en la membrana plasmática de células gliales y neuronales; (2) transportadores dependientes de sodio/potasio que funcionan en la membrana plasmática, especialmente en el transporte de Glu; y (3) transportadores vesiculares que llevan a cabo la recaptura dentro de vesículas sinápticas y gránulos (Nelson y Lill, 1994).

Los transportadores de Gly pertenecen a la familia de transportadores que dependen de Na^+ y Cl^- , junto con los de GABA, prolina, betaína, taurina y aminas biogénicas. Todos los miembros de esta familia presentan una estructura general similar. La mayoría de los transportadores están constituidos por 600 aminoácidos arreglados en 12 segmentos transmembranales. Tanto el extremo carboxilo-terminal como el extremo amino-terminal se encuentran del lado citoplásmico de la membrana. Estas regiones contienen sitios posibles de fosforilación que pueden estar involucrados en la regulación del transporte. También presentan una gran asa extracelular entre los segmentos transmembranales III y IV donde se localizan de 2 a 4 sitios de glicosilación (Amara y Kuhar, 1993).

La comparación de la secuencia de aminoácidos de varios miembros de esta familia reveló que ciertos segmentos de estas proteínas presentan un mayor grado de homología que otros. Las regiones más conservadas son: el

segmento transmembranal I junto con el asa extracelular que lo conecta con el segmento transmembranal II, y el segmento transmembranal V junto con la pequeña asa intracelular que lo conecta con el segmento IV y el asa extracelular más grande que lo conecta con el segmento VI (Fig. 6). Se ha propuesto que estos dominios están involucrados en la estabilización de la estructura terciaria que es esencial para el funcionamiento de estos transportadores, así como en la translocación de iones sodio. La parte de la proteína compuesta por los ocho primeros segmentos transmembranales está más conservada que las que componen el resto de los segmentos, se piensa que este dominio está involucrado en la translocación de los diferentes sustratos. Las regiones menos conservadas de todas son los extremos amino- y carboxilo-terminal, por lo que se ha propuesto que estas áreas están involucradas en la regulación del transporte (Kanner, 1994).

La Gly es un aminoácido no esencial que, además de tener diversas funciones metabólicas, es un neurotransmisor inhibitor clásico que actúa en la médula espinal, tallo cerebral y retina (Aprison, 1990). Ejerce su efecto inhibitor a través de un canal de cloro sensible a ligando, y este efecto se antagoniza competitivamente por la estricnina (Langosch *et al.*, 1990). Además de su papel inhibitor en el sistema nervioso, la Gly también modula la neurotransmisión excitadora actuando como coagonista del Glu en los receptores del tipo NMDA. El sitio de unión de la Gly en estos receptores es insensible a estricnina, mientras que la D-serina y la D-alanina reproducen el efecto de la Gly (Fletcher *et al.*, 1990).

Desde 1963 se sabía que varios aminoácidos, incluyendo la glicina, eran incorporados por el tejido nervioso en rebanadas de cerebro. Aprison y Werman (1965) fueron los primeros en proponer que debía existir un mecanismo de **captura** para la Gly que la eliminara del espacio de las sinapsis inhibitoras;

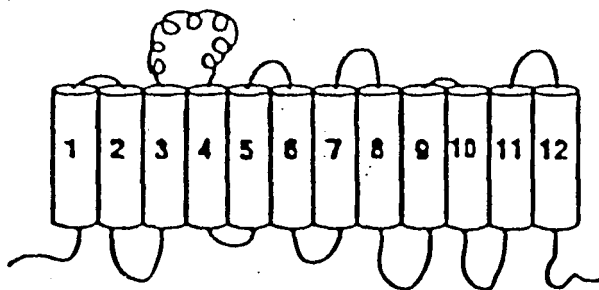


Figura 6. Organización propuesta de los 12 segmentos transmembranales y asas periféricas para la familia de transportadores dependiente de Na^+/Cl^- (Nelson y Lill, 1994).

posteriormente otros grupos propusieron que los sistemas de captura para los aminoácidos neurotransmisores debían presentar una mayor afinidad por sus sustratos que los sistemas de captura para el resto de los aminoácidos. En 1971, Johnston e Iversen reportaron la presencia de dos sistemas de transporte para la Gly en preparaciones de médula espinal de rata, uno de alta afinidad y otro de baja afinidad; en la corteza cerebral sólo se detectó el sistema de baja afinidad. Poco tiempo después, Logan y Snyder (1972) demostraron que el sistema de transporte de la Gly en la corteza cerebral de la rata tenía un solo componente de baja afinidad ($K_m = 760 \mu\text{M}$), mientras que en la médula espinal el análisis de la cinética del transporte reveló dos componentes, uno de alta afinidad con una $K_m = 26 \mu\text{M}$ y otro de baja afinidad con una $K_m = 923 \mu\text{M}$. Sugirieron entonces que el sistema de alta afinidad era el principal responsable de terminar la transmisión glicinérgica en las sinapsis inhibitorias en la médula espinal (Aprison, 1990).

Se han identificado varios sistemas que transportan Gly en distintos tejidos que se distinguen entre sí por diferencias en su dependencia iónica así como en la afinidad por su sustrato. De los sistemas que dependen de Na^+ y Cl^- , el sistema Gly es específico para la glicina y su derivado N-metilado, la sarcosina. El sistema A transporta aminoácidos que presentan cadenas laterales cortas, polares o lineales como la alanina, la glicina, el ácido 2-aminoisobutírico y su derivado N-metilado el ácido 2-(metilamino)isobutírico (MeAIB). Este sistema de transporte depende de Na^+ y su actividad disminuye conforme lo hace el pH extracelular. Un tercer sistema de transporte de Gly se ha caracterizado en células animales, al cual se le ha llamado sistema ASC por transportar también alanina, serina y cisteína (Christensen, 1984).

Varios estudios en células gliales han demostrado la presencia de sistemas de transporte de Gly en estas células (Zafra y Giménez, 1989; Zafra y Giménez, 1986; Holopainen y Kontro, 1989).

Hasta la fecha, se han clonado dos transportadores distintos de glicina: GLYT1 y GLYT2. El transportador GLYT1 (Smith *et al.*, 1992; Guastella *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1992) presenta tres isoformas producidas por cortes alternativos y/o uso diferencial del promotor (Borowsky *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1994; Adams *et al.*, 1995). Estas isoformas difieren en el extremo amino-terminal y son nombradas GLYT1a, GLYT1b y GLYT1c (Liu *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1994; Adams *et al.*, 1995). La isoformas GLYT1a y GLYT1b que se clonaron a partir de una biblioteca de cerebro de ratón (Liu *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1993) equivalen a los transportadores GLYT2 y GLYT1, respectivamente, en la nomenclatura propuesta por Borowsky y colaboradores (1993) (Tabla 1). A partir de una biblioteca de cDNAs de sustancia *nigra* de humano, Kim *et al.* (1995) clonaron tanto la isoforma GLYT1a como la isoforma GLYT1b y además encontraron una tercera isoforma funcional a la cual nombraron GLYT1c.

El transportador GLYT2 es el producto de un gen distinto del de las isoformas de GLYT1. Presenta un extremo amino-terminal muy extenso y se localiza predominantemente en la médula espinal y tallo cerebral. Esta distribución de GLYT2 concuerda con la distribución de los receptores de Gly sensibles a estricnina, por lo que se propone que este transportador está involucrado en la terminación y modulación de la neurotransmisión glicinérgica en el cerebro posterior (Jursky y Nelson, 1995). Se ha propuesto que el transportador GLYT2 se presenta únicamente en neuronas y no en la glía (Luque *et al.*, 1995).

Tabla 1. Heterogeneidad de la Nomenclatura de los Transportadores de Gly

Nombre en Raton	Nombre en Rata	Nombre en Humano
GLYT1a (Liu <i>et al.</i> , 1993)	GLYT1 (Guastella <i>et al.</i> , 1992) GLYT2 (Borowsky <i>et al.</i> , 1993)	GLYT1a (Kim <i>et al.</i> , 1994)
GLYT1b (Liu <i>et al.</i> , 1993)	GLYT1 (Borowsky <i>et al.</i> , 1993)	GLYT1b (Kim <i>et al.</i> , 1994)
GLYT1c (Adams <i>et al.</i> , 1995)	GLYT1c (Adams <i>et al.</i> , 1995)	GLYT1c (Kim <i>et al.</i> , 1994)
GLYT2 (Liu <i>et al.</i> , 1993)	GLYT2 (Luque <i>et al.</i> , 1995)	

Las variantes de GLYT1 se distinguen de GLYT2 por su sensibilidad a la sarcosina (N-metilglicina). La sarcosina inhibe competitivamente el transporte de glicina llevado a cabo por GLYT1, mientras que GLYT2 es insensible a ésta (Liu *et al.*, 1993).

La expresión de GLYT1a y de GLYT1b en ratas y ratones adultos ha sido estudiada por hibridación *in situ* y análisis de Northern blot (Guastella *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1992; Borowsky *et al.*, 1993). Los resultados de estos estudios son contradictorios pues mientras Kim y colaboradores (1994) y Borowsky y colaboradores (1993) reportaron la expresión de GLYT1 en tejidos no neuronales como riñón e hígado, Liu y colaboradores (1993), Guastella y

colaboradores (1992) y Smith y colaboradores (1992) reportaron la expresión de GLYT1 exclusivamente en tejido neuronal.

Ambas variantes de GLYT1 se expresan en varias regiones del SNC incluyendo al hipotálamo, mesencéfalo, tallo cerebral y médula espinal. Borowsky y colaboradores (1993), utilizando sondas específicas para GLYT1a y GLYT1b, demostraron que presentaban patrones de distribución distintos en el SNC. GLYT1b se expresa específicamente en el SNC y GLYT1a se expresa tanto en el SNC como en tejidos no neuronales tales como hígado, páncreas, pulmones, bazo y estómago. Encontraron que el mRNA de GLYT1a se presenta en regiones con una alta densidad de cuerpos neuronales (materia gris), mientras que el RNAm de GLYT1b se presenta casi exclusivamente en regiones donde predomina la materia blanca. Ya que el transportador GLYT1a también se clonó a partir de una biblioteca de glioma C6 de rata (Guastella *et al.*, 1992), Borowsky y colaboradores (1993) sugirieron que GLYT1a es un transportador de glicina tanto neuronal como glial, mientras que GLYT1b es un transportador de glicina exclusivo de las células gliales. Sin embargo, Adams y colaboradores (1995) encontraron que ninguna isoforma de GLYT1 se expresaba en neuronas, por lo que concluyeron que tanto GLYT1a como GLYT1b y GLYT1c se expresan principal o exclusivamente en las células gliales; expresándose GLYT1a principalmente en las células gliales presentes en la materia blanca y GLYT1b en las células gliales presentes en la materia gris. Por otro lado, demostraron que las isoformas GLYT1a y GLYT1b se originan de la transcripción iniciada por promotores alternativos, mientras que GLYT1c es una variante que se origina por procesamiento alternativo del transcrito de GLYT1b.

Smith *et al.* (1992) encontraron que GLYT1b se expresa tanto en regiones de transmisión glicinérgica como en regiones de transmisión por aminoácidos excitadores como el hipocampo y la corteza, áreas donde se

presentan altos niveles de receptores de NMDA. Por ello sugirieron que en estas zonas el transportador de glicina GLYT1b juega un papel importante en la transmisión excitadora modulando la actividad de la glicina en estos receptores.

Por medio de estudios inmunocitoquímicos en la retina, Zafra *et al.* (1995), encontraron que en este tejido, únicamente se expresan las variantes del transportador GLYT1. En contraste con el resto del sistema nervioso, las variantes de GLYT1 no se localizaron en las células gliales, sino en las células amacrinas de la parte interna de la capa nuclear interna y en las terminales de la capa plexiforme interna. Estos autores relacionaron al transportador con los receptores de Gly sensibles a estricnina que se encuentran en la capa plexiforme interna en los elementos neuronales con los que mantienen sinapsis las células amacrinas con inmunorreactividad a la Gly.

ANTECEDENTES

En la retina de pollo, se han identificado sitios de unión de Glu, uno dependiente de sodio y sensible a la congelación que corresponde a un sitio de captura, y otro que es independiente de sodio, insensible a la congelación, y que representa a los receptores sinápticos (López-Colomé, 1981). Estos receptores para Glu se han localizado principalmente en células amacrinas, ganglionares y células horizontales, aunque también en menor proporción en células bipolares (López-Colomé y Somohano, 1984), y se han caracterizado en membranas de células de la retina de pollo mediante la unión de ligandos marcados radiactivamente. Se han descrito receptores tanto del tipo NMDA (López-Colomé y Somohano, 1992) como de KA y AMPA (López-Colomé y Somohano, 1987). También se han caracterizado receptores del tipo NMDA en las células de Müller de retina de pollo, acoplados a la cascada de fosfoinosítidos, la entrada de Ca^{2+} y la activación de la proteína cinasa C (PKC).

Debido a que las células gliales de Müller se localizan radialmente a todo lo largo de la retina de los vertebrados (Robinson y Dreher, 1990), y entre las células neurales de la retina existen vías glutamatérgicas en las que participan receptores del tipo NMDA, la presencia de un sistema de transporte de Gly en la glía de Müller que regule la concentración de Gly en el espacio sináptico podría modular la actividad de estos receptores, en los que la Gly actúa como coagonista del Glu.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es el de demostrar la presencia de un sistema de transporte de Gly en las células de la glía de Müller y caracterizarlo tanto bioquímica como farmacológicamente. Estos datos permitirán establecer una comparación con los sistemas de transporte de Gly que se han descrito en el sistema nervioso central, y esclarecer la función de la glía radial en el proceso de la neurotransmisión.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. CULTIVO PRIMARIO DE LA GLÍA DE MÜLLER DE RETINA DE POLLO

Las células de Müller se cultivaron según la técnica descrita por Adler y colaboradores (1982) y modificada por López-Colomé y Romo-de-Vivar (1991). Se obtuvieron las retinas de embriones de pollo de 7 días. Se extrajeron separándolas del epitelio pigmentado y se lavaron dos veces en solución de Hank libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} (NaCl 0.8 g, KCl 0.04 g, KH_2PO_4 0.006 g, Na_2HPO_4 0.0125 g, rojo de feno 0.002 g y glucosa 0.1 g en 100 ml de H_2O). Después de lavadas las retinas se incubaron 10 minutos en tripsina al 0.25% en solución de Hank a 37°C. La reacción enzimática se detuvo con L-MEM [1.338 g de medio Eagle, modificación de Dubelcco (ver apéndice), 0.05 g de glucosa, 0.022 g de NaHCO_3 en 100 ml, al cual se le agregó 0.025% de PNS (penicilina, neomicina, estreptomina) y 0.025% de gentamicina] y 1% de albúmina bovina (BSA). Las células se disociaron mecánicamente utilizando una pipeta Pasteur y se filtraron a través de una red de nylon de 50 μM , y se suspendieron en H-MEM (L-MEM

más 0.22 gr de NaHCO_3) sin suero fetal bovino. Se cuantificó el número de células con un contador Coulter modelo ZB1 (Coulter Electronics, Inc.) y la suspensión celular se diluyó a un millón de células/ml. Las células se sembraron en placas de 12 y de 24 pozos (de 24 y 18 mm de diámetro respectivamente), en las placas de 12 pozos se sembraron 500,000 células por pozo y en las de 24 pozos se sembraron 250,000 células por pozo, colocando el mismo volumen de medio HMEM con 20% de suero fetal bovino. Se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 durante 12 ó 13 DIV (días *in vitro*), tiempo al cual el cultivo alcanzó la confluencia. El medio de cultivo (H-MEM 10% de suero fetal bovino) se cambió cada tercer día.

Las células de los cultivos fueron identificadas como glía de Müller ya que los cultivos fueron inmunopositivos para el anticuerpo policlonal contra la GFAP (proteína ácida fibrilar glial) que también es un marcador de astrocitos. Ya que la retina de las aves es avascularizada y no presenta astrocitos (Rasmussen, 1974), la marca corresponde a la glía de Müller (López-Colomé y Romo-de-Vivar, 1991).

II. ENSAYOS DE TRANSPORTE DE GLICINA

Los ensayos de transporte se realizaron con cultivos confluentes de células de Müller de 12 ó 13 DIV. Al inicio de todos los ensayos, el medio de cultivo se eliminó por aspiración con una pipeta Pasteur y los cultivos se lavaron 3 veces con 1 ml (placas de 12 pozos) o con 0.5 ml (placas de 24 pozos) de Ringer Krebs Bicarbonato (RKB) que contenía NaCl 118 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, KCl 4.7 mM, CaCl_2 2.5 mM, NaHCO_3 25 mM, glucosa 5.6 mM y MgSO_4 1.4 mM,

a 37°C. En seguida se agregó 1 ml ó 0.5 ml de KRB en el cual se realizaron los distintos ensayos. Al final de cada ensayo, los cultivos se lavaron 3 veces con las mismas cantidades de KRB, pero esta vez a 4°C. Posteriormente se agregó a cada pozo 1 ml de HCl 1N, se desprendió la monocapa celular con un gendarme y se aspiraron los pozos colocando el contenido en viales, los cuales se taparon y se calentaron a 100°C para hidrolizar el tejido. Una vez que el tejido se disoció, se le agregó a cada vial 1ml de NaOH 1N para neutralizar al HCl y posteriormente 5 ml de Tritosol (Fricke, 1975). La radiactividad se cuantificó en un contador de centelleo líquido. Todos los ensayos se realizaron a 37°C.

De cada experimento se determinó la cantidad de proteína de 1 pozo, por el método de Lowry *et al.* (1951).

a. Transporte de Glicina a un compartimiento osmóticamente sensible

Para los ensayos de captura de Gly a un compartimiento osmóticamente sensible se incubaron los cultivos con Gly 1mM (la proporción de glicina tritiada con respecto a la fría fue de 1:25000) durante 10 minutos a 37°C. Se siguió el procedimiento descrito anteriormente para el lote control. Al lote experimental se le aplicó un choque osmótico agregando 1 ml de buffer Tris-HCl a cada pozo en lugar del HCl 1N, se desprendió la monocapa celular, se aspiraron los pozos colocando el contenido en tubos de microfuga y se centrifugaron durante 3 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 1 ml de HCl 1N para continuar con el resto del procedimiento desde la hidrólisis ácida.

b. Curva de tiempo del transporte

Para realizar la curva de tiempo del transporte de Gly, los cultivos se incubaron con Gly 1mM a diferentes tiempos: 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 minutos. La proporción de glicina tritiada con respecto a la fría fue de 1:25000. La reacción se detuvo como en los casos anteriores.

c. Dependencia energética del transporte

El efecto que tienen distintos inhibidores metabólicos sobre el transporte de Gly se probó incubando a los cultivos durante 15 minutos con los inhibidores metabólicos: dinitrofenol (DNP) 50 μ M, cianuro de potasio (KCN) 1 mM, Iodacetato 1 mM y ouabaina 200 μ M y posteriormente se agregó la Gly 1 mM ([³H]-Gly/glicina fría 1:25000) para realizar el ensayo de transporte durante 20 minutos.

d. Efecto del pH del medio extracelular sobre el transporte

Para estudiar el efecto de los cambios de pH del medio extracelular sobre el transporte de Gly se preparó medio Krebs a distintos pHs. Para el medio Krebs pH 5 y pH 6 se sustituyó al NaHCO_3 por acetato de sodio (CH_3COONa) 0.381 g/20 ml y 0.544 g/20 ml (respectivamente) y se tituló con ácido acético (CH_3COOH) al 20%; para el medio pH 7.4 se utilizó el medio KRB normal; el medio pH 8 se preparó sustituyendo al NaHCO_3 por HEPES 0.2382 g/20 ml y se tituló con hidróxido de potasio (KOH) al 20%, y para el medio pH 8.9 se sustituyó

al NaHCO_3 por Trizma base 0.6057 g/100 ml y se tituló con HCl 0.5 N. Los cultivos se incubaron en los distintos medios con Gly 1 mM (la proporción de glicina tritlada con respecto a la fría fue de 1:25000) durante 10 minutos.

e. Especificidad del transporte

Para los ensayos de competencia se realizaron ensayos de transporte de Gly 1 mM (^3H -Gly/Gly fría 1:25000) en presencia de distintos competidores (1mM): taurina, b-alanina, D-serina y GABA, durante 10 minutos.

f. Cinética del transporte

Los ensayos para estudiar la cinética del transporte de Gly se realizaron incubando los cultivos durante 10 minutos con Gly a diferentes concentraciones: 0.01 mM, 0.025 mM, 0.05 mM, 0.1 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM y 2 mM. La proporción ^3H -Gly/Gly fría fue de 1:5000.

g. Dependencia iónica del transporte

La dependencia iónica del transporte se estudió sustituyendo, en el caso del Na^+ , al NaCl (118 mM) del medio KRB por cloruro de colina (118 mM) y por cloruro de litio (118 mM) y al NaHCO_3 (25 mM) por KHCO_3 (25 mM). En el caso del Cl^- , se substituyó al NaCl del medio (118 mM) por gluconato de sodio (118 mM). En estos medios se incubaron los cultivos durante 10 minutos en presencia de una concentración alta de Gly, 1 mM, para observar el

comportamiento del componente de baja afinidad, o a una baja concentración de Gly, 0.01 mM, para observar el comportamiento del componente de alta afinidad. La proporción [^3H]-Gly/Gly fría fue de 1:25000 (alta [glicina]) y de 1:5000 (baja [glicina]).

h. Efecto de la nigericina sobre el transporte

Para estudiar el efecto de la nigericina (ionóforo de Na^+) sobre el transporte, se preincubaron los cultivos durante 15 minutos con nigericina 5 μM en medio KRB o en medio KRB sin sodio en el que el NaCl 118 mM se sustituyó isosmóticamente por cloruro de colina y el NaHCO_3 (25 mM) por KHCO_3 (25 mM). Posteriormente se cambiaron los medios con nigericina por KRB normal para realizar el ensayo de transporte con Gly 1 mM ([^3H]-Gly/Gly fría 1:25000) durante 10 minutos.

i. Efecto de la sarcosina sobre el transporte

El efecto de la sarcosina (N-metilglicina) se estudió llevando a cabo los ensayos de transporte en presencia de sarcosina. Para observar el efecto que tiene sobre el componente de baja afinidad, los ensayos de transporte se efectuaron durante 20 minutos en presencia de Gly 1mM (alta [glicina]) ([^3H]-Gly/Gly fría 1:25000) y sarcosina 2 mM. Para estudiar el efecto de la sarcosina sobre el componente de alta afinidad del transporte, los ensayos de transporte se llevaron a cabo durante 20 minutos en presencia de Gly 0.01 mM (baja [glicina]) ([^3H]-Gly/Gly fría 1:5000) y 1 mM de sarcosina.

III. ANÁLISIS DE LA CINÉTICA DEL TRANSPORTE Y ESTADÍSTICA

Los datos obtenidos a partir de la curva de saturación del transporte de Gly, se analizaron por el método de Eadie-Hofstee, que consiste en graficar la velocidad del transporte (ordenadas), V (nmol de Gly/mg de proteína X 10 minutos), contra el cociente $V/[S]$ (abscisas), donde $[S]$ es la concentración de Gly (mM) correspondiente para esa velocidad. Una vez obtenida esta curva, se calcularon las pendientes de la curva por medio de una regresión lineal, utilizando un programa BASIC convencional. A partir de la regresión lineal se calcularon las constantes de afinidad (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}) del sistema de transporte. La V_{max} es el punto de intersección de la recta con el eje de las abscisas y la K_m se calcula a partir de la ecuación de la recta $y = mx + b$. ya que $m = -1/K_m$ y $V_{max} = x$ cuando $y = 0$, tenemos que $K_m = V_{max}/b$.

Para establecer si los lotes experimentales presentaban diferencias significativas con respecto a los controles se aplicaron pruebas de t de Student con la ayuda del paquete de cómputo para estadística LOTUS.

IV. REACTIVOS

La $[^3H]$ -Gly de actividad específica = 17.5 Ci/mmol se obtuvo de Amersham Life Science y la $[^3H]$ -Gly de actividad específica = 42 Ci/mmol y 43.8 Ci/mmol se obtuvo de DuPont NEN Research Products. El cianuro de potasio (KCN) se obtuvo de Baker. El medio Eagle modificación de Dulbecco se obtuvo de Gibco BRL Life Technologies y todos los demás reactivos fueron de Sigma.

RESULTADOS

I. CAPTURA DE GLY EN UN COMPARTIMENTO OSMÓTICAMENTE SENSIBLE

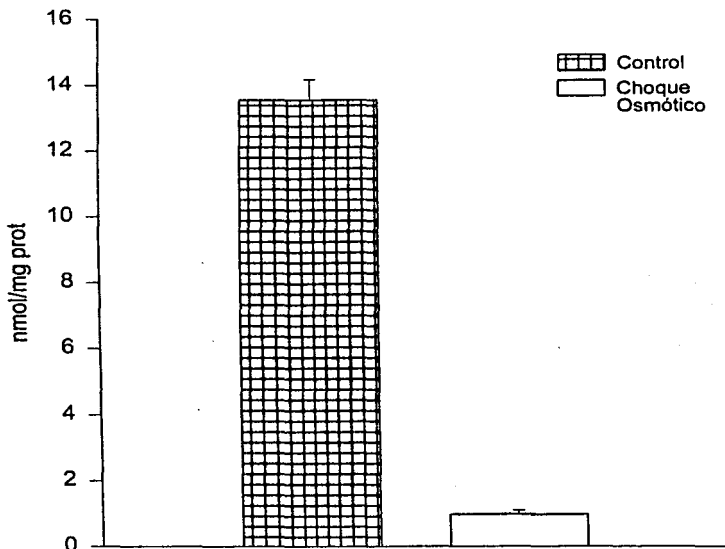
Para comprobar que efectivamente se lleva a cabo el transporte de Gly en las células de Müller, después del ensayo de transporte, los cultivos se sometieron a un choque osmótico por medio del cual se liberó el contenido celular al medio y se midió la radiactividad restante en las membranas celulares. Como se muestra en la gráfica 1, en los cultivos sometidos al choque osmótico la radiactividad disminuyó hasta el 7.2% con respecto al control, lo que significa que el 92.7% de la Gly fue transportada al interior de las células.

II. CURSO TEMPORAL DEL TRANSPORTE DE GLY

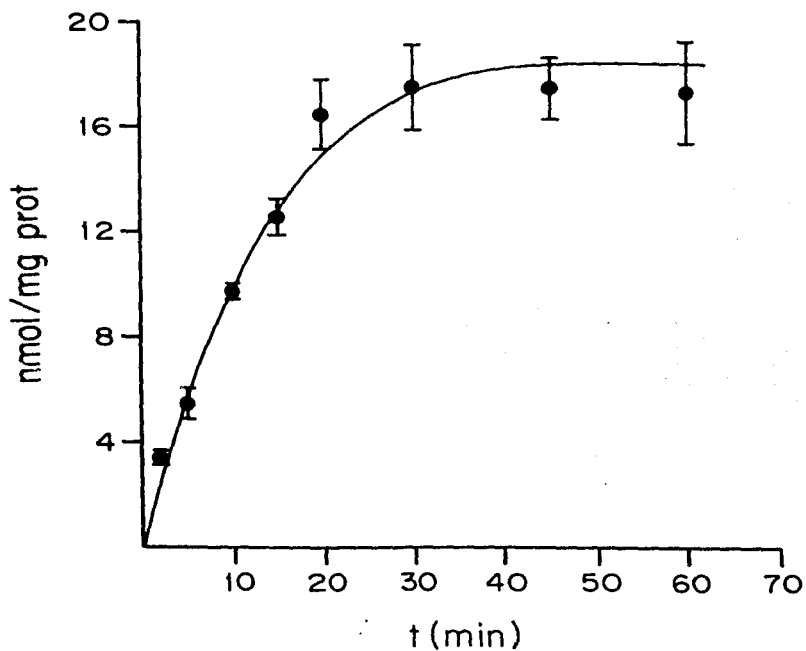
Para averiguar el tiempo al cual se satura el sistema se realizó una curva de tiempo. La gráfica 2 muestra el curso temporal del transporte de Gly y se observa que el sistema llega al equilibrio a los 20 minutos.

III. DEPENDENCIA ENERGÉTICA DEL TRANSPORTE DE GLY

La gráfica 3 muestra el efecto de distintos inhibidores metabólicos sobre el transporte de Gly. El cianuro de potasio (KCN), el iodacetato y el dinitrofenol son inhibidores de la producción de energía metabólica, esto es, de ATP. El cianuro de potasio bloquea la transferencia de electrones entre la citocromo



Gráfica 1. Transporte de Glicina hacia un compartimento osmóticamente sensible. Se realizó el ensayo de transporte en presencia de glicina 1mM (gly-[³H]/gly 1:25000) durante 20 minutos. Posteriormente, el lote experimental se sometió a choque osmótico agregando 1 ml de buffer Tris-HCl 10 mM a cada pozo. Los resultados se muestran como la media \pm ES de tres experimentos por triplicado.



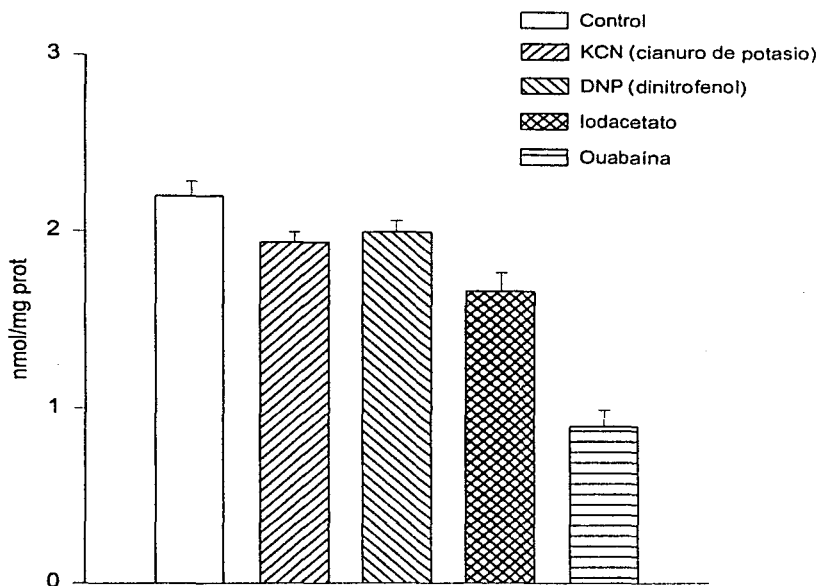
oxidasa y el oxígeno, por lo que inhibe tanto la respiración como la síntesis de ATP. El dinitrofenol es un desacoplante de la fosforilación oxidativa; ya que contiene un protón dissociable y es altamente hidrofóbico, actúa transportando protones a través de la membrana mitocondrial interna, disipando así el gradiente de protones. El iodacetato inhibe la producción de ATP a partir de la glucólisis, pues es un potente inhibidor de la gliceraldehído-3'fosfato deshidrogenasa ya que se une de manera covalente con el grupo -SH de la enzima, que es esencial para el sitio activo (Lehninger *et al.*, 1993).

La ouabaina pertenece a un grupo de esteroides derivados de plantas a los que se les conoce como esteroides cardiotónicos, los cuales actúan como potentes inhibidores de la ATPasa Na^+/K^+ . Los esteroides cardiotónicos inhiben la reacción de desfosforilación de la ATPasa Na^+/K^+ , estabilizando la forma fosforilada. La inhibición de la bomba Na^+/K^+ por la ouabaina conduce a un mayor nivel de Na^+ en el interior de la célula disminuyendo por lo tanto el gradiente de Na^+ a través de la membrana.

Los resultados muestran que el cianuro de potasio inhibió al transporte en un 12% con respecto al control; el iodacetato lo inhibió en un 24% y la ouabaina en un 59% (ver tabla 2).

IV. SENSIBILIDAD A LOS CAMBIOS DE pH

Para averiguar si el sistema de transporte de Gly en las células de Müller es sensible a los cambios de pH del medio extracelular, se realizó la captura de Gly en medios con distintos pHs. En la gráfica 4 se muestra que el transporte



Gráfica 3. Efecto de inhibidores metabólicos sobre el transporte de glicina. Se incubaron los cultivos con los inhibidores metabólicos durante 15 minutos a las siguientes concentraciones: KCN 1mM, DNP 50 μ M, iodacetato 1mM y ouabaina 200 μ M. Posteriormente se realizó el ensayo de transporte en presencia de glicina 25 μ M (gly-[3 H]/gly 1:625) durante 20 minutos. Los resultados se muestran como la media de 4 experimentos por triplicado \pm ES.

de Gly es sensible a estos cambios de pH; el pH óptimo para el transporte es 7.4.

Tabla 2. Efecto de inhibidores metabólicos sobre el transporte de glicina

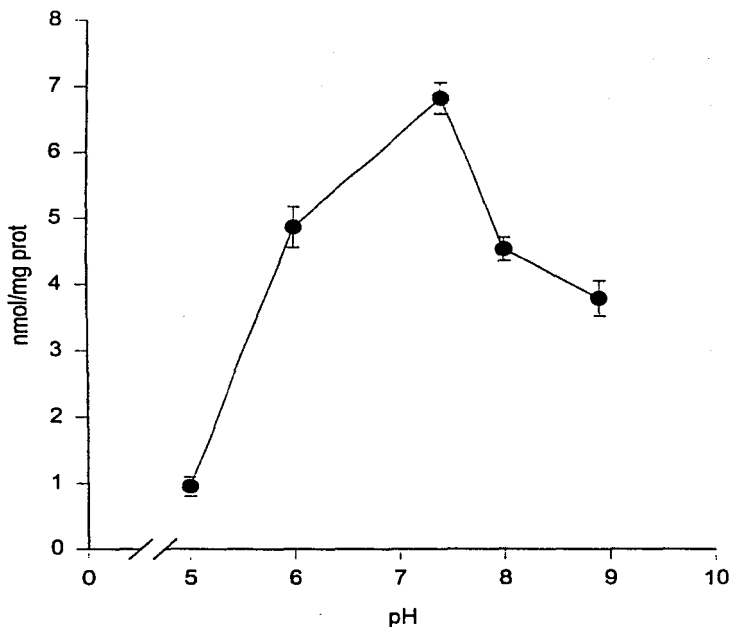
Condición	Transporte de Glicina nmol (mg de prot) ⁻¹ (20 min) ⁻¹
Control	2.19 ± 0.083 (100)
Cianuro de Potasio	1.93 ± 0.057* (88)
Dinitrofenol	1.99 ± 0.064 (91)
Iodacetato	1.66 ± 0.010** (76)
Ouabaina	0.89 ± 0.093*** (41)

Los valores son la media ± ES de 4 experimentos por triplicado. Los valores en paréntesis representan el porcentaje del transporte con respecto al control. Para comparar los valores obtenidos con el control se aplicó una prueba de t de Student: * $P < 0.05$, ** $P < 0.02$, *** $P < 0.001$.

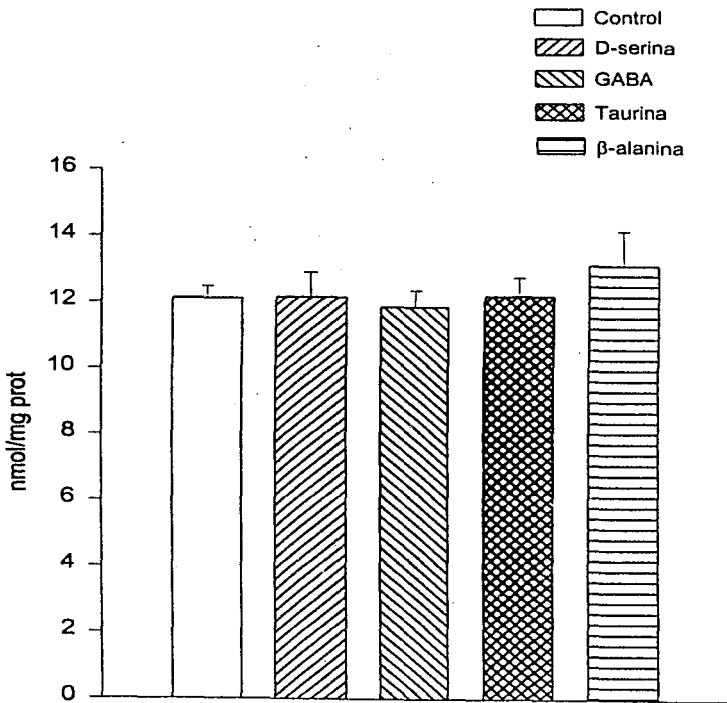
V. ESPECIFICIDAD DEL SISTEMA DE TRANSPORTE

Para determinar qué tan específico es el sistema de transporte para la Gly, se probó el efecto de distintos aminoácidos estructuralmente relacionados sobre el transporte de Gly.

La D-serina actúa como agonista de la Gly en los receptores para Glu del tipo NMDA (Fletcher *et al.*, 1990).



Gráfica 4. Efecto del pH extracelular sobre el transporte de glicina. Los cultivos se incubaron 10 minutos en presencia de glicina (1mM, gly- 3 H)/gly 1:25000) con medio Krebs a distintos pHs: 5, 6, 7.4, 8 y 8.9. Cada punto es la media de cuatro experimentos por triplicado \pm ES.



Gráfica 5. Efecto de competidores sobre el transporte de glicina. Los cultivos se incubaron durante 20 minutos en presencia de los competidores 1mM y de glicina 1mM (gly-[³H]/gly 1:25000). Los resultados se muestran como la media ± ES.

La taurina se encuentra a altas concentraciones tanto en el sistema nervioso central como en la retina de vertebrados, especialmente en las células fotorreceptoras y se ha propuesto que actúa como neuromodulador o como neurotransmisor inhibidor. La β -alanina inhibe competitivamente el transporte de GABA en la neuroglia. Tanto la taurina como la β -alanina actúan como agonistas de la Gly en los receptores para Gly sensibles a estrocnina (Langosch *et al.*, 1990).

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibidor en áreas del cerebro anterior, mientras que la Gly juega el papel análogo en el tallo cerebral y médula espinal.

En la gráfica 5 se observa que ninguno de los posibles competidores probados tuvo efecto alguno sobre el transporte de Gly (ver tabla 3).

Tabla 2. Efecto de distintos aminoácidos sobre el transporte de glicina

Condición	Transporte de Glicina nmol (mg de prot) ⁻¹ (10 min) ⁻¹
Control	12.11 \pm 0.37 (100)
D-serina	12.17 \pm 0.74 (100.4)
GABA	11.87 \pm 0.49 (98)
Taurina	12.19 \pm 0.59 (100.6)
β -alanina	13.14 \pm 1.04 (108)

Los valores son la media \pm ES de 3 experimentos por triplicado. Los valores en paréntesis representan el porcentaje del transporte con respecto al control. Para comparar los valores obtenidos con el control se aplicó una prueba de t de Student, en ningún caso se obtuvieron diferencias significativas.

VI. CINÉTICA DEL TRANSPORTE DE GLY

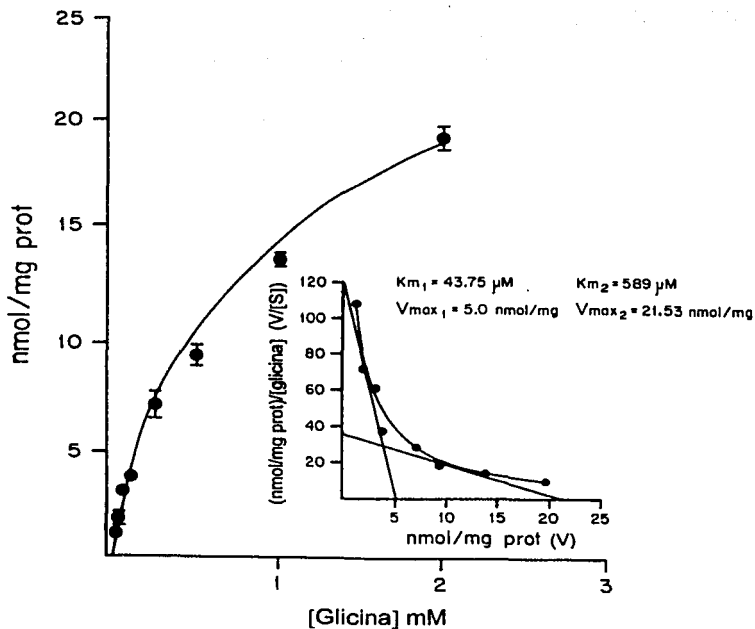
La gráfica 6 muestra la curva de saturación del transporte de Gly así como el análisis de Eadie-Hofstee (gráfica interior). El resultado de este análisis demostró la presencia de dos componentes del sistema de transporte, uno de alta afinidad por la Gly con una K_m de 43.75 μM y una V_{max} de 5.0 nmol (mg de proteína)⁻¹ (10 minutos)⁻¹, y otro de menor afinidad por la Gly con una K_m de 589 μM y una V_{max} de 21.53 nmol (mg de proteína)⁻¹ (10 minutos)⁻¹.

VII. DEPENDENCIA IÓNICA DEL TRANSPORTE

Para estudiar los requerimientos iónicos de ambos componentes del transporte se utilizaron 2 concentraciones distintas de Gly. Para estudiar el comportamiento del componente de baja afinidad, se utilizó una concentración alta de Gly (1 mM), y para estudiar el comportamiento del componente de alta afinidad se utilizó una concentración baja de Gly (0.01 mM).

La gráfica 7 muestra los resultados de dependencia iónica para el componente de baja afinidad. Cuando se sustituyó isosmóticamente al Cl⁻ del medio añadiendo gluconato de Na⁺ en lugar de NaCl, las diferencias en el transporte de Gly no fueron estadísticamente significativas; mientras que al sustituir el Na⁺ del medio por colina o Li⁺, el transporte se inhibió en un 76% y en un 81% respectivamente (ver tabla 4).

En la gráfica 8 se observa la dependencia iónica del componente de alta afinidad del transporte de Gly. En este caso, la sustitución del cloro por el gluconato afectó al transporte inhibiéndolo un 51% con respecto al control. La



Gráfica 6. Cinética del transporte de glicina. Los cultivos se incubaron durante 10 minutos en presencia de glicina a distintas concentraciones (^3H -Gly/Gly 1:5000). Cada punto es el promedio de por lo menos dos experimentos por triplicado \pm ES. En la gráfica interior se observa el análisis de Eadie-Hofstee.

Tabla 4. Dependencia iónica del componente de baja afinidad

Condición	Transporte de Glicina nmol (mg de prot) ⁻¹ (10 min) ⁻¹
Control	6.74 ± 0.371 (100)
Gluconato de Na ⁺	5.49 ± 0.485 (82)
Cloruro de Colina	1.61 ± 0.124*** (24)
Cloruro de Li ⁺	1.31 ± 0.106*** (19)

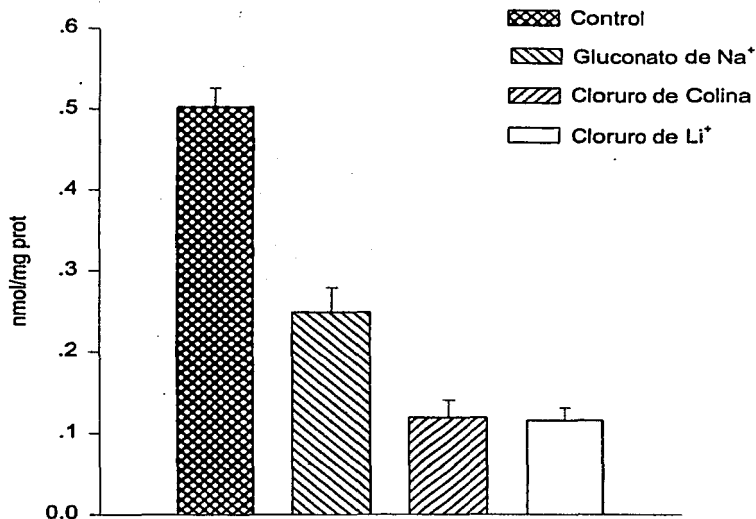
Los valores son la media ± ES de 3 experimentos por triplicado. Los valores en paréntesis representan el porcentaje del transporte con respecto al control. Para comparar los valores obtenidos con el control se aplicó una prueba de t de Student: ***P < 0.001.

Tabla 5. Dependencia iónica del componente de alta afinidad

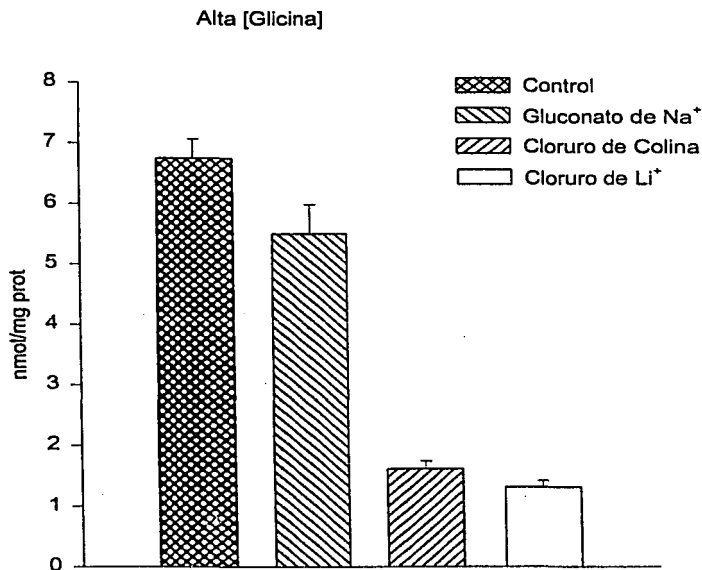
Condición	Transporte de Glicina nmol (mg de prot) ⁻¹ (10 min) ⁻¹
Control	0.502 ± 0.023 (100)
Gluconato de Na ⁺	0.249 ± 0.030** (49)
Cloruro de Colina	0.119 ± 0.021*** (23.6)
Cloruro de Li ⁺	0.116 ± 0.015*** (23)

Los valores son la media ± ES de 3 experimentos por triplicado. Los valores en paréntesis representan el porcentaje del transporte con respecto al control. Para comparar los valores obtenidos con el control se aplicó una prueba de t de Student: **P < 0.02 ***P < 0.001.

Baja [Glicina]



Gráfica 7. Dependencia iónica del transporte de glicina a bajas concentraciones. Los ensayos de transporte se llevaron a cabo durante 10 min en presencia de glicina 0.01 mM (gly[3H]/gly 1:5000), en los distintos medios: Krebs sin cloro (gluconato de Na⁺), Krebs sin sodio (cloruro de colina), Krebs sin sodio (cloruro de Li⁺) y Krebs normal con NaCl (control), los resultados se muestran como la media de tres experimentos por triplicado \pm ES.



Gráfica 8. Dependencia iónica del transporte de glicina a altas concentraciones. Los ensayos de transporte se llevaron a cabo durante 10 min en presencia de glicina 1 mM ($\text{gly}^3\text{H}/\text{gly}$ 1:25000), en los distintos medios: Krebs sin cloro (gluconato de Na^+), Krebs sin sodio (cloruro de colina), Krebs sin sodio (cloruro de Li^+) y Krebs normal con 118 mM de NaCl (control). los resultados se muestran como la media \pm ES.

sustitución de Na⁺ por colina o por litio ocasionó la disminución del transporte en un 76.4% y en un 77% respectivamente (ver tabla 5).

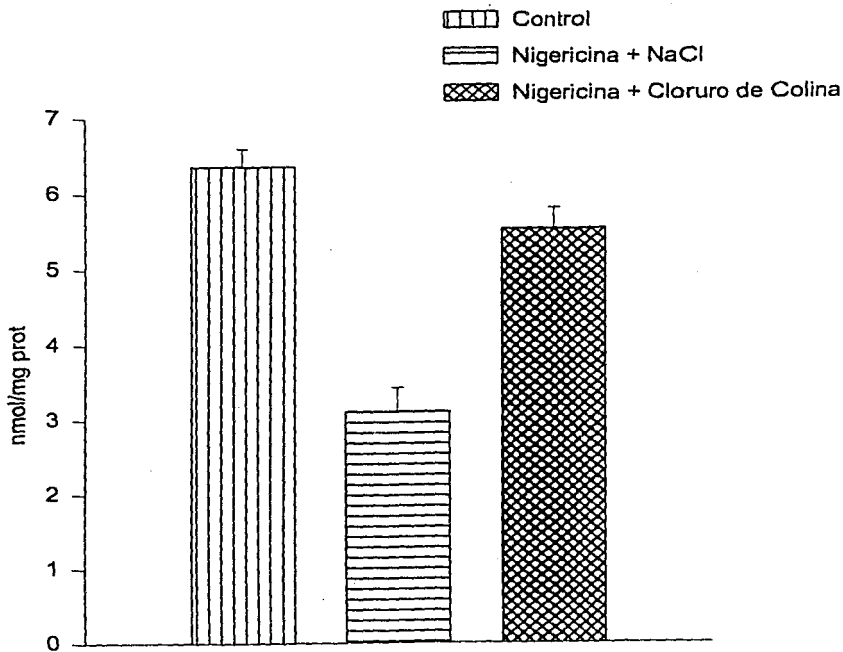
VIII. EFECTO DE LA NIGERICINA SOBRE EL TRANSPORTE

La nigericina actúa como un ionóforo de sodio, es decir, como un compuesto portador de iones sodio. La nigericina se combina reversiblemente con estos iones formando un complejo permeable a la membrana plasmática que difunde a través de ésta liberando al sodio en el interior de la célula. La nigericina también puede actuar, aunque en menor medida, como ionóforo de otros iones como el potasio o el magnesio.

La gráfica 9 muestra que el preincubar con nigericina en presencia de sodio en el medio, inhibe el transporte de Gly en un 51% con respecto al control, mientras que el preincubar con nigericina en un medio carente de sodio inhibe al transporte en únicamente un 13% (ver tabla 6).

IX. EFECTO DE LA SARCOSINA SOBRE EL TRANSPORTE DE GLY

La sarcosina es un Nmetil derivado de la Gly, y es sustrato específico para el transporte que lleva a cabo el sistema reportado como GLYT1. Para ver el efecto que ésta ejerce sobre ambos componentes del sistema de transporte de Gly, se llevaron a cabo ensayos de transporte en presencia



Gráfica 9. Efecto de la nigericina sobre el transporte de glicina. Los cultivos se preincubaron con nigericina $5 \mu\text{M}$ durante 15 minutos en medio Krebs con sodio (NaCl) y en medio Krebs sin sodio (cloruro de colina), el control no se preincubó con nigericina. El ensayo de transporte se realizó durante 10 minutos cambiando los medios por Krebs normal (NaCl), en presencia de glicina $1 \text{ mM}(\text{gly}[^3\text{H}]/\text{gly} 1:25000)$. Los resultados se muestran como la media de tres experimentos por triplicado \pm ES.

Tabla 6. Efecto de la nigericina sobre el transporte

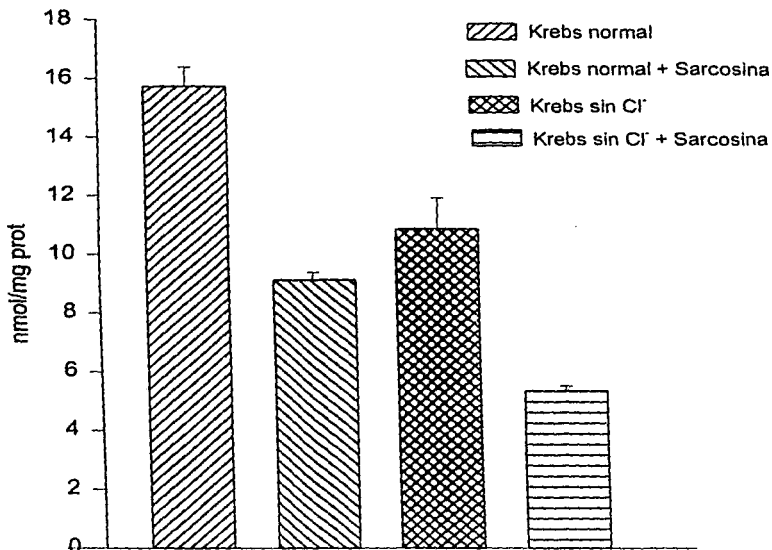
Condición	Transporte de Glicina nmol (mg de prot) ⁻¹ (10 min) ⁻¹
Control	6.35 ± 0.23 (100)
Nigericina + NaCl	3.10 ± 0.31*** (48)
Nigericina + Cloruro de colina	5.51 ± 0.27* (87)

Los valores son la media ± ES de 3 experimentos por triplicado. Los valores en paréntesis representan el porcentaje del transporte con respecto al control. Para comparar los valores obtenidos con el control se aplicó una prueba de t de Student: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

de sarcosina, tanto a altas como a bajas concentraciones de Gly, con o sin cloro en el medio de incubación, pues los componentes del sistema de transporte mostraron diferencias en el requerimiento de este ión (gráficas 10 y 11, tablas 7 y 8).

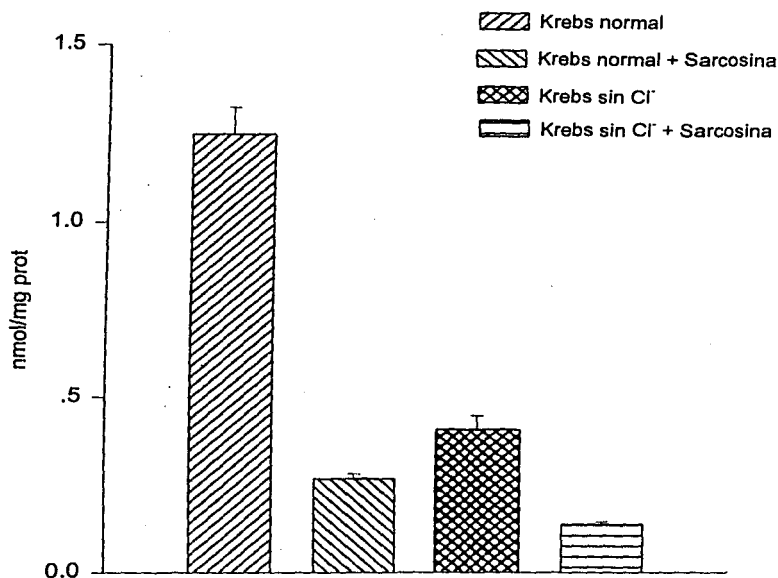
La gráfica 10 muestra el efecto de la sarcosina a altas concentraciones de Gly. El control representa el transporte total llevado a cabo por ambos componentes del transporte, pues el ensayo se realizó en medio KRB normal. En estas condiciones, la sarcosina inhibió al transporte, de manera competitiva, en un 42%. El ensayo realizado en medio Krebs sin Cl⁻ que se muestra en la misma gráfica, representa al componente de baja afinidad del transporte y el efecto que la sarcosina ejerce sobre éste. En este caso, la sarcosina inhibió al transporte en un 50% (tabla7).

Alta [Glicina]



Gráfica 10. Efecto de la sarcosina sobre el transporte de glicina a altas concentraciones. Los ensayos de transporte se llevaron a cabo durante 10 minutos en los distintos medios en presencia de glicina (1mM GlyH³/Gly 1:25000) y sarcosina (2mM). Los resultados se muestran como la media \pm ES.

Baja [Glicina]



Gráfica 11. Efecto de la sarcosina sobre el transporte de glicina a bajas concentraciones. Los ensayos de transporte se llevaron a cabo durante 10 minutos en los distintos medios en presencia de glicina (0.01mM GlyH⁺/Gly 1:5000) y sarcosina (1mM). Los resultados se muestran como la media \pm ES.

Tabla 7. Efecto de la sarcosina sobre el transporte de glicina: alta concentración

Condición	Transporte de Glicina nmol (mg de prot) ⁻¹ (20 min) ⁻¹
Control KRB normal	15.73 ± 0.65 (100)
KRB normal + sarcosina	9.11 ± 0.36** (58)
Control KRB sin cloro	10.82 ± 1.05 (100)
KRB sin cloro + sarcosina	5.34 ± 0.16*** (50)

Los valores son la media ± ES de 2 experimentos por triplicado. Los valores en paréntesis representan el porcentaje del transporte con respecto al control. Para comparar los valores obtenidos con el control se aplicó una prueba de t de Student: **P < 0.02, ***P < 0.001.

Tabla 7. Efecto de la sarcosina sobre el transporte de glicina: baja concentración

Condición	Transporte de Glicina nmol (mg de prot) ⁻¹ (20 min) ⁻¹
Control KRB normal	1.247 ± 0.075 (100)
KRB normal + sarcosina	0.266 ± 0.014*** (20)
Control KRB sin cloro	0.406 ± 0.039 (100)
KRB sin cloro + sarcosina	0.136 ± 0.006*** (40)

Los valores son la media ± ES de 2 experimentos por triplicado. Los valores en paréntesis representan el porcentaje del transporte con respecto al control. Para comparar los valores obtenidos con el control se aplicó una prueba de t de Student: **P < 0.02, ***P < 0.001.

La gráfica 11 muestra el efecto de la sarcosina a bajas concentraciones de Gly. El control representa al componente de alta afinidad del transporte y la sarcosina inhibió este transporte en un 80%. En estas mismas condiciones pero en medio sin cloro, tenemos una pequeña fracción del componente de baja afinidad sobre el cual la sarcosina actuó inhibiendo el transporte competitivamente en un 60% (tabla 8).

DISCUSIÓN

Las células de Müller forman parte de la glía radial y atraviesan todo el espesor de la retina. En la retina de las aves son el único tipo de glicocito presente, por lo que llevan a cabo numerosas funciones que, en otras regiones del sistema nervioso central, desempeñan los astrocitos, los oligodendrocitos y las células ependimales (Ripps y Witkovsky, 1985).

Por estudios previos se ha demostrado que las células de Müller, además de expresar canales sensibles a voltaje y receptores de neurotransmisores, a través de los cuales reconocen una gran variedad de señales neuronales, expresan sistemas de transporte de alta afinidad para la recaptura de sustancias neuroactivas como el Glu, el GABA y el K^+ .

Las células gliales juegan un papel muy importante en remover los neurotransmisores del espacio extracelular después de que se liberan de las terminales sinápticas. Esta recaptura es esencial para terminar la transmisión sináptica así como para evitar que los transmisores difundan lejos del espacio sináptico. Ya que las células de Müller poseen sistemas de transporte para neurotransmisores a través de los cuales pueden regular los niveles extracelulares de éstos en la retina, y presentan procesos que se ramifican extensamente en las dos capas sinápticas de la retina (las capas plexiformes), se ha propuesto que las células de Müller pueden modular la actividad neuronal, participando así activamente en la función de la retina.

El objetivo de este trabajo fue el de demostrar la presencia de un sistema de transporte de Gly en la glía de Müller de la retina, que regule las concentraciones extracelulares de este aminoácido. Los resultados obtenidos indican que, efectivamente, en estas células se lleva a cabo la recaptura de Gly

hacia el interior de la célula (compartimento osmóticamente sensible) y el sistema alcanza el equilibrio en 20 minutos (ver resultados).

El estudio de los transportadores de neurotransmisores ha revelado que la fuerza motriz del transporte es el gradiente electroquímico de Na^+ que mantienen las ATPasas Na^+/K^+ presentes tanto en las neuronas como en las células gliales. El co-transporte del neurotransmisor con iones Na^+ a favor del gradiente electroquímico de este ión, proporciona la energía necesaria para conducir al neurotransmisor hacia el interior de la célula en contra de su gradiente de concentración (Kanner, 1994). El estudio de la dependencia energética del transporte a través de distintos inhibidores metabólicos, mostró que el transporte de Gly depende de energía metabólica en forma de ATP, pues el cianuro de potasio y el iodacetato, que inhiben la producción de éste, provocaron la disminución del transporte. Este efecto inhibitor se debe probablemente a que la disminución en la producción de ATP afecta directamente la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ que requiere de una molécula de ATP para expulsar 3 iones Na^+ e introducir 2 iones K^+ . Esta suposición se ve corroborada por el hecho de que la ouabaína, la cual actúa directamente inhibiendo de manera muy potente a la ATPasa Na^+/K^+ , tuvo un fuerte efecto sobre el transporte disminuyéndolo en un 59% (ver resultados). Diversos estudios han demostrado que la actividad de los transportadores de neurotransmisores puede verse modificada por eventos de fosforilación (Casado *et al.*, 1993; Gomeza *et al.*, 1991), tal podría ser el caso del sistema de transporte de Gly en las células de Müller. De ser así, la disminución en la producción de ATP afectaría directamente la actividad de este sistema. Esta podría ser otra de las razones por las cuales el tratamiento de las células con iodacetato y cianuro de potasio provoca cierta disminución en el transporte.

El transporte de Gly en las células de Müller también resultó ser sensible a los cambios de pH del medio extracelular siendo 7.4 el pH óptimo para el transporte. El cambio de pH en el medio puede ocasionar tanto cambios conformacionales en la molécula transportadora, afectando así su función, como cambios en la carga de la Gly que podrían evitar que el transportador la reconociera como sustrato.

El transporte de aminoácidos ha sido estudiado en distintos tipos de células animales y se han identificado tanto sistemas de transporte que dependen de Na^+ como sistemas independientes de este ión. Con base en los patrones de competencia entre los aminoácidos y en la dependencia iónica, Oxender y Christensen (1963) propusieron los siguientes sistemas de transporte capaces de llevar a cabo la captura de Gly en distintos tipos celulares: El sistema Gly, que depende de Na^+ y es el más específico para la glicina, pues sólo transporta a este aminoácido y a su N-metil derivado, la sarcosina, es muy sensible a los cambios de pH del medio y se encuentra ampliamente distribuido en distintos tejidos (Christensen y Handlogten, 1981); el sistema A, que también depende de Na^+ , cuyo sustrato son los aminoácidos que tienen una cadena lateral corta, polar o lineal como la glicina, la alanina y el análogo no metabolizable, ácido 2-aminoisobutírico así como su derivado N-metilado el ácido 2-(metilamino)isobutírico (MeAIB), que también es muy sensible a los cambios de pH; el sistema ASC, también dependiente de Na^+ , que transporta principalmente alanina, serina y cisteína, excluye a los aminoácidos N-metilados y transporta aminoácidos aniónicos al disminuir el pH; y por último, el sistema L, que no depende de sodio sino que transporta a los aminoácidos a favor de su gradiente de concentración y cuyo sustrato principal son los aminoácidos aromáticos (Christensen, 1984).

Los resultados obtenidos de los ensayos de competencia demostraron que el sistema de transporte en las células de Müller es altamente específico para la glicina pues la presencia de otros aminoácidos en el medio no tuvo ningún efecto sobre el transporte de glicina (ver capítulo de resultados). El análisis de la cinética del transporte reveló que el sistema de transporte en estas células tiene dos componentes, uno de alta afinidad por la glicina con una K_m de $43.75 \mu\text{M}$ y una V_{max} de $5.0 \text{ nmol}(\text{mg de proteína})^{-1}(10 \text{ min})^{-1}$ y otro de baja afinidad por la glicina con una K_m de $589 \mu\text{M}$ y una V_{max} de $21.53 \text{ nmol}(\text{mg de proteína})^{-1}(10 \text{ min})^{-1}$.

Una vez identificados los dos componentes del transporte, se utilizaron distintas concentraciones de Gly (una alta y una baja), para estudiar la dependencia iónica de los dos componentes así como su sensibilidad a la sarcosina. Los resultados demostraron que el sistema de alta afinidad depende tanto de Na^+ como de Cl^- en el medio extracelular para llevar a cabo el transporte de Gly, lo que lo hace muy similar a los sistemas de transporte de alta afinidad que se han estudiado en el sistema nervioso, es decir, a las isoformas de GLYT1 y GLYT2. En cuanto a su sensibilidad a la sarcosina, este componente del sistema resultó muy sensible a la sarcosina, disminuyendo el transporte en un 80%. Ya que el sistema GLYT2 es insensible a la sarcosina, debe de tratarse de alguna de las isoformas de GLYT1.

El estudio del transporte de Gly en el sistema nervioso se ha centrado en los sistemas de alta afinidad, pues su principal función es la de terminar la neurotransmisión con la recaptura de los neurotransmisores hacia la terminal sináptica o células gliales (Kanner, 1994). Estos transportadores se han clonado y ha sido posible expresarlos en sistemas de expresión heteróloga como ovocitos de *Xenopus laevis*, así como realizar estudios de hibridación *in situ* para su localización en las distintas regiones del sistema nervioso. En la tabla 8

se muestran las constantes de afinidad y la velocidad máxima de los sistemas de transporte de Gly estudiados en el sistema nervioso. Comparando las constantes de afinidad, el sistema de transporte que caracterizamos en las células de Müller ($K_m = 43.75 \mu\text{M}$) es muy similar al reportado por Guastella y colaboradores (1992) (ver tabla 9), caracterizado en una línea celular denominada C6 de glioma de cerebro de rata ($K_m = 44.7 \mu\text{M}$) que corresponde a la isoforma GLYT1a (Liu *et al.*, 1993). La sarcosina inhibió en un 85% al transporte de Gly reportado por Guastella y colaboradores (1992) y en un 80% en nuestros ensayos realizados en la glía de Müller. Guastella *et al.* (1992) relacionaron a este transportador de Gly con los receptores inhibidores de glicina sensibles a estricnina. Por medio de estudios de hibridación *in situ* esta isoforma de GLYT1 se localizó en áreas del sistema nervioso central como la médula espinal y el tallo cerebral, ricas en transmisión glicinérgica y por lo tanto en receptores inhibidores de Gly. Reportaron su presencia principalmente en cuerpos neuronales, aunque no descartaron la posibilidad de que se encontrara también en elementos gliales. Ya en el cerebelo localizaron al transportador en la glía de Bergmann.

Estudios posteriores de hibridación *in situ* realizados por Liu y colaboradores (1993) utilizando sondas específicas para GLYT1a y GLYT1b demostraron que la distribución de GLYT1 era generalizada y que se relacionaba con las áreas del sistema nervioso central donde predomina la transmisión excitadora en la que participan los receptores del tipo NMDA, como es el caso de las células granulares del cerebelo. Este mismo grupo reportó la existencia del sistema GLYT2 y demostró que éste, y no GLYT1, se co-localiza con los receptores de glicina sensibles a estricnina. Por su parte, Smith *et al.* (1992) ya habían reportado la co-localización del transportador GLYT1 (que

corresponde a GLYT1b, Liu *et al*, 1993) con los receptores del tipo NMDA en el sistema nervioso central.

Tabla 9. Valores de K_m y V_{max} de los distintos sistemas de transporte de glicina estudiados

Transporte de glicina en las células de Müller de la retina

alta afinidad _____ $K_m = 43.75 \mu M$
 $V_{max} = 5 \text{ nmol/mg prot X } 10 \text{ min}$
baja afinidad _____ $K_m = 589 \mu M$
 $V_{max} = 21.53 \text{ nmol/ mg prot X } 10 \text{ min}$

Zafra y Giménez (1986) en vesículas aisladas de cultivos de células de glioblastoma

alta afinidad _____ $K_m = 100 \mu M$
 $V_{max} = 0.32 \text{ nmol/mg prot X min}$
baja afinidad _____ $K_m = 2.6 \text{ mM}$
 $V_{max} = 1.59 \text{ nmol/mg prot X min}$

Zafra y Giménez (1989) en células de glioblastoma en cultivo

alta afinidad _____ $K_m = 95 \mu M$
 $V_{max} = 1.85 \text{ nmol/mg prot X min}$
baja afinidad _____ $K_m = 2.45 \text{ mM}$
 $V_{max} = 13.5 \text{ nmol/mg prot X min}$

Liu Qing-Rong *et al* (1992) GLYT1 de cerebro de ratón

alta afinidad _____ $K_m = 25 \mu M$
 $V_{max} = 150 \text{ pmol/ovocito X hr}$

Liu Qing-Rong *et al* (1993) GLYT2 de cerebro de ratón

alta afinidad _____ $K_m = 17 \mu M$
 $V_{max} = 36 \text{ pmol/ovocyte X hr}$

Smith *et al* (1992) de cerebro de rata

alta afinidad _____ $K_m = 123 \mu M$

Kim *et al* (1994) de sustancia nigra de humano y de cerebro de ratón

alta afinidad _____ $K_m = 70-90 \mu M$

Borowsky *et al* (1993) de células leucémicas basofílicas de rata

alta afinidad _____ $K_m = 94 \mu M$

Guastella *et al* (1992) de células C6 de glioma

alta afinidad _____ $K_m = 44.7 \mu M$
 $V_{max} = 390 \text{ pmol/ovocito X hr}$

Otros estudios han sugerido que GLYT1 se expresa exclusivamente en elementos gliales, expresándose GLYT1a principalmente en las células gliales presentes en la materia blanca y GLYT1b en las células gliales presentes en la materia gris (Adams *et al*, 1995).

Ya que las células de Müller se orientan radialmente desde la capa de los fotorreceptores hasta la capa de células ganglionares, y la vía vertical de transmisión de los fotorreceptores a las células bipolares y de éstas a las células ganglionares es excitadora, hemos relacionado al transportador de Gly de alta afinidad con los receptores de Glu del tipo NMDA en los que la Gly actúa como coagonista del Glu. Por otro lado, estos receptores también se han caracterizado en la glia de Müller (López-Colomé y Romo, 1991), por lo que el transportador de Gly también podría estar modulando la actividad de estos receptores en la misma glia.

El receptor de NMDA requiere para su activación que se ocupe tanto el sitio de unión para el Glu como el sitio de unión para la Gly. Se ha sugerido que la concentración de Gly en el fluido extracelular es lo suficientemente alta como para saturar su sitio de unión, pues el añadir Gly a rebanadas de cerebro tuvo poco efecto sobre la respuesta de los receptores de NMDA (Thomson *et al.*, 1989). Sin embargo, en las células granulares del cerebelo, donde el transportador de Gly GLYT1 es muy abundante, las corrientes sinápticas mediadas por el receptor de NMDA no se producían a menos de que se añadiera Gly al medio (D'Angelo *et al*, 1990). Esto es un indicio de que los sistemas de transporte de glicina realmente pueden influenciar la actividad de estos receptores.

Como ya se mencionó, el estudio de los transportadores de Gly se ha centrado en los sistemas de alta afinidad, por lo que poco se sabe de los sistemas de transporte de baja afinidad. Zafra y Giménez (1986) caracterizaron

un sistema de baja afinidad para la Gly tanto en vesículas obtenidas a partir de membranas de células de glioblastoma como en cultivos de células de glioblastoma. Dichos autores encontraron que el sistema de baja afinidad en estas células presenta dos componentes: el sistema A y el sistema ASC (ambos dependientes de Na^+ pero independientes de Cl^-). Sin embargo, la principal proporción del transporte de glicina la lleva a cabo el sistema ASC, que se expresa de manera constitutiva en las células. La constante de afinidad por la glicina para este sistema es de 2.45 mM y la velocidad máxima es de 13.5 $\text{nmol}(\text{mg de prot})^{-1}(\text{min})^{-1}$ y, además de la glicina, este sistema transporta a la serina y a la alanina. La sarcosina tiene un leve efecto sobre este sistema de transporte.

El componente de baja afinidad que se caracterizó en este trabajo presenta una K_m de 589 μM y una V_{max} de 21.53 $\text{nmol}(\text{mg de prot})^{-1}(\text{min})^{-1}$, y ni la alanina ni la serina afectaron el transporte de Gly. El estudio de la dependencia iónica de este transportador mostró una alta dependencia por el Na^+ , mientras que la ausencia de Cl^- no afectó de manera significativa al transporte. Los ensayos con nigericina corroboraron la dependencia de Na^+ de ambos componentes; al incubar los cultivos en medio con Na^+ y nigericina (ionóforo de Na^+) el gradiente de Na^+ a un lado y a otro de la membrana celular (que es la fuerza motriz del transporte), se abate por la entrada de sodio a la célula a favor de su gradiente de concentración, disminuyendo así el transporte de Gly. Cuando se incubaba con nigericina en ausencia de Na^+ el transporte prácticamente no se modifica, ya que el gradiente de Na^+ no se abate. Sin embargo, la pequeña disminución de alrededor del 10% que se observa en el transporte de Gly puede deberse a que la nigericina también funciona como un ionóforo de K^+ , ocasionando una ligera despolarización en las células que a su vez provocaría una pequeña disminución en el transporte. Se ha visto que en

condiciones fisiológicas, la despolarización de las células ocasiona que los transportadores de neurotransmisores funcionen en sentido opuesto liberando al sustrato en lugar de capturarlo (Atwell *et al.*, 1993).

La sarcosina inhibió al transporte de Gly llevado a cabo por el componente de baja afinidad en un 50%, en condiciones de alta Gly y medio sin cloro. Por lo tanto, este sistema de transporte presenta características muy distintas del resto de los sistemas de transporte de Gly de baja afinidad. Este sistema de transporte de baja afinidad en la glía de Müller podría desempeñar funciones metabólicas como de nutrición. Por otro lado, podría contribuir a la recaptura de Gly en el espacio sináptico cooperando con el componente de alta afinidad en eliminar a la Gly poco después de ser liberada, cuando su concentración es alta.

En un principio se propuso que los transportadores de glicina de alta afinidad estudiados en el sistema nervioso pertenecían al sistema Gly ya que, al igual que este sistema, presentan una alta especificidad por la glicina y son sensibles a la sarcosina (Guastella *et al.*, 1992; Zafra y Giménez, 1989). Con el descubrimiento del transportador GLYT2, insensible a la sarcosina, se propuso que GLYT1 correspondía al sistema Gly (Kim *et al.*, 1995). Sin embargo, estudios realizados sobre estos transportadores, como análisis de northern blot e hibridación *in situ*, demostraron que tanto GLYT1 como GLYT2 son específicos del tejido neuronal, por lo que se han considerado como un sistema diferente del sistema Gly, el cual está presente en tejidos no neurales tales como hepatocitos y células sanguíneas (Smith *et al.*, 1992).

La presencia de un sistema de transporte de Gly en las células de la glía de Müller de la retina, apoya la idea de que las células gliales pueden modular la actividad neuronal al controlar la concentración de sustancias neuroactivas en el fluido extracelular que baña al sistema nervioso. Este transportador de Gly

podría modular la actividad de los receptores del tipo NMDA que participan en la vía vertical de transmisión en la retina, aunque también existe la posibilidad de que modulen la actividad de los receptores de Gly sensibles a estricnina que reciben estímulos glicinérgicos principalmente de las células amacrinas (Iuvone, 1986). El hecho de que las células de Müller presenten receptores a aminoácidos excitadores sugiere que estas células pueden participar en la modulación de las sinapsis entre los elementos neurales de la retina, ya que pueden recibir estímulos y responder a ellos. En estudios futuros se pretende establecer si existe alguna relación entre los receptores a aminoácidos excitadores y el sistema de transporte de Gly en la glía de Müller.

Ya que la Gly puede participar en los procesos de excitotoxicidad al potenciar el efecto del Glu en los receptores de NMDA, el estudio de los transportadores de Gly podría llevar al desarrollo de nuevas drogas para tratar ciertos padecimientos neurodegenerativos.

CONCLUSIONES

A pesar de que estudios anteriores reportaron la ausencia de transporte de Gly en la glía de la retina (Zafra *et al.*, 1995), este estudio demuestra que las células de la glía de Müller de la retina presentan dicho sistema de transporte de Gly.

Este sistema es altamente específico para la Gly y se inhibe selectivamente por la sarcosina, es sensible a los cambios de pH del medio extracelular y presenta un pH óptimo de 7.4.

El transporte depende del gradiente de Na^+ y requiere de energía metabólica, ya que el iodacetato, el cianuro de potasio y la ouabaína mostraron un efecto inhibitorio sobre el mismo.

El sistema de transporte de Gly en estas células presenta dos componentes, uno de alta afinidad con características muy similares al reportado por Guastella *et al.* (1992) y uno de baja afinidad, con características diferentes a los sistemas de transporte de baja afinidad reportados previamente (Zafra y Giménez, 1989).

Ambos componentes dependen de la presencia de Na^+ y el de alta afinidad depende además de la presencia de Cl^- en el medio.

La existencia de receptores para aminoácidos excitadores y transportadores de Gly en las células de Müller sugiere que estas células participan activamente en la neurotransmisión excitadora de la retina en la que participan los receptores del tipo NMDA.

APÉNDICE

Medio Eagle Modificación de Dulbecco

	mg/l
CaCl ₂	200.00
Fe(NO ₃) ₉ H ₂ O	0.10
KCl	400.00
MgSO ₄	97.67
NaCl	6400.00
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	125.00
D-glucosa	4500.00
Rojo de fenol	15.00
L-Arginina	84.00
L-Cisteína	63.00
L-Glutamina	584.00
Glicina	30.00
L-Histidina	42.00
L-Isoleucina	105.00
L-Leucina	105.00
L-Lisina	146.00
L-Metionina	30.00
L-Fenilalanina	66.00
L-Serina	42.00
L-Treonina	95.00
L-Triptofano	16.00
L-Tirosina	104.00
L-Valina	94.00
D-Ca pantotenato	4.00
Cloruro de colina	4.00
Acido Fólico	4.00
D-Inositol	7.20
Niacinamida	4.00
Pirodoxal	4.00
Tiamina	4.00
Riboflavina	0.40

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, R. H., K. Sato, S. Shimada, M. Tohyama, A. W. Püschel y H. Betz (1995) Gene structure and glial expression of the glycine transporter GLYT1 in embryonic and adult rodents. *J. Neurosci.*, 15(3): 2524-2532.
- Adler, R., P. Magistretti, A. Hyndman y W. Shoemaker (1982) Purification and cytochemical identification of neuronal and non neuronal cells in chick embryo retina cultures. *Dev. Neurosci.*, 5:27-39.
- Amara, S. y Kuhar, M. (1993) Neurotransmitter transporters - recent progress. *A. Rev. Neurosci.*, 16: 73-93.
- Aprison, M. H. (1990) The discovery of the neurotransmitter role of glycine. En: *Glycine Neurotransmission*. John Wiley and Sons, Ltd, New York. 1-23 pp.
- Aprison, M. H. y R. Werman (1965) The distribution of glycine in cat spinal cord and roots. *Life Sci.*, 4:2075-2083.
- Attwell, D., B. Barbour y M. Szatkowsky (1993) Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron*, 11:401-407.
- Barondes, S. H. (1994) Thinking about Prozac. *Science* 263: 1102-1103.
- Bartlett, P. P., M. D. Noble, R. M. Pruss, M. C. Raff, S. Rattray y C. A. Williams (1981) Rat neuronal antigen 2 (Ran 2): a cell surface antigen on astrocytes, ependymal cells, Müller cells, and leptomeninges defined by a monoclonal antibody. *Brain Res.*, 204:339-351.
- Boje, K. M., P. Skolnick, J. Raber, R. T. Fletcher y G. Chader (1992) Strychnine-insensitive glycine receptors in embryonic chick retina: characteristics and modulation of NMDA neurotoxicity. *Neurochem. Int.*, 20:473-486.
- Borowsky, B., E. Mezey y B. J. Hoffman (1993) Two glycine transporter variants with distinct localization in the CNS and peripheral tissues are encoded by a common gene. *Neuron*, 10:851-863.
- Bouvier, M., M. Szatkowsky, A. Amato y D. Attwell (1992) The glial cell glutamate uptake carrier countertransports pH-changing anions. *Nature*, 360:471-474.

- Casado, M., A. Bendahan, F. Zafra, N. C. Danbolt, C. Aragón, C. Giménez y B. Kanner (1993) Phosphorylation and modulation of brain glutamate transporters by protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, 268(36):27313-27317.
- Christensen, H. N. (1984) Organic ion transport during seven decades. The amino acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 799:255-269.
- Daw, N. W., W. J. Brunken y D. Parkinson (1989) The function of synaptic transmitters in the retina. *Ann. Rev. Neurosci.*, 12:205-225.
- Dowling, J. E. (1970) Organization of vertebrate retinas. *Invest. Ophthalmol.*, 9:655-680.
- Farber, D. y R. Adler (1986) The Retina. A Model for Cell Biology Studies. Academic Press, Inc. Orlando, USA. 363 pp.
- Fletcher, E. J., P. M. Beart y D. Lodge (1990) Involvement of glycine in excitatory neurotransmission. En: *Glycine Neurotransmission*. John Wiley and Sons, Ltd, New York. 193-218 pp.
- Gomez, J., M. Casado, C. Giménez y C. Aragón (1991) Inhibition of high-affinity γ -aminobutyric acid uptake in primary astrocyte cultures by phorbol esters and phospholipase C. *Biochem. J.*, 275:435-439.
- Graham, L. T. (1972) Intraretinal distribution of GABA content and GAD activity. *Brain Res.*, 36:476-479.
- Guastella, J., N. Brecha, C. Weigmann, H. A. Lester y N. Davidson (1992) Cloning, expression and localization of a rat brain high-affinity glycine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:7189-7193.
- Heumann, R., J. Villegas y D. W. Herzfeld (1981) Acetylcholine synthesis in the Schwann cell and axon in the giant nerve fiber of the squid. *J. Neurochem.*, 36:765-768.
- Iuvone, M. P. (1986) Neurotransmitters and neuromodulators in the retina: regulation, interactions and cellular effects. En: *The Retina: A model for Cell Biology Studies*. Part II. Academic Press, Inc. Orlando, USA. 348 pp.
- Jursky, F., Tamura, S., Tamura, A., Mandiyan, S., Nelson, H. y Nelson, N. (1994) Structure, function and brain localization of neurotransmitter transporters. *J. exp. Biol.* 196: 283-295.

- Kanai, Y. y Hediger, M. A. (1992) Primary structure and functional of a high affinity glutamate transporter. *Nature* 360: 467-471.
- Kandel, E. R., J. H. Schwartz y T. M. Jessell (1991) *Principles of Neural Science*. Elsevier. New York. 1135 pp.
- Kanner, B. I. (1994) Sodium-coupled neurotransmitter transport: structure, function and regulation. *J. exp. Biol.* 196: 237-249.
- Kim, K.M., S. F. Kingsmore, H. Han, T. L. Yang-Fen, N. Godinot, M. F. Seldin, M. G. Caron y B. Giros (1994) Cloning of the human glycine transporter type 1: molecular and pharmacological characterization of novel isoform variants and chromosomal localization of the gene in the human and mouse genomes. *Mol. Pharmacol.*, 45:608-617.
- Kuhar, M. J., Ritz, M. C. y Boja, J. W. (1991) The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. *Trends Neurosci.* 14: 299-302.
- Lam, D. M. K., Y. Y. T. Su, L. Swain, R. E. Marc, C. Brandon y J. Y. Wu (1979). Immunocytochemical localization of L-glutamic acid decarboxylase in the goldfish retina. *Nature*, 278:565-567.
- Langosch D., C. M. Becker y H. Betz (1990) Molecular structure and developmental regulation of the inhibitory glycine receptor. En: *Glycine Neurotransmission*. John Wiley and Sons, Ltd, New York. 67-82 pp.
- Liu, Q.R., H. Nelson, S. Mandiyan, B. López-Corcuera y N. Nelson (1992) Cloning and expression of a glycine transporter from mouse brain. *FEBS Lett*, 305:110-114.
- Liu, Q.R., López-Corcuera, B., Mandiyan, S., Nelson, H. y Nelson, N. (1993) Cloning and expression of a spinal cord and brain-specific glycine transporter with novel structural features. *J. Biol. Chem.*, 268: 22802-22808.
- López-Colomé, A. M., R. Tapia, R. Salceda y H. Pasantes-Morales (1978) Potassium stimulated release of GABA, glycine and taurine from the chick retina. *Neurochem. Res.*, 3:431-441.
- López-Colomé, A. M., A. Ortega y M. Romo-de-Vivar (1993) Excitatory amino acid-induced phosphoinositide hydrolysis in Müller glia. *Glia*, 9:127-135.
- López-Colomé, A.M. y M. Romo (1991) Excitatory amino acid receptors in primary cultures of glial cells from the retina. *Glia*, 4:431-439.

- Magalhaes, M. M. y A. Coimbra (1973) Electron microscope autoradiographic detection of sites of protein synthesis in the rabbit retina Müller cells. *J. Cell Biol.*, 57:77-87.
- McNamara, D. y R. Dingledine (1988) Potentiation by glycine of *N*-methyl-D-aspartate induced excitotoxicity in rat cortical cell culture. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 14:97.
- Miller, R. F. y M. M. Slaughter (1985) Excitatory amino acid receptors in the vertebrate retina. En: *Retinal transmitters and modulators: models for the brain. Vol II.* CRC Press, Inc. Florida, USA. 167 pp.
- Moscona, A. A. (1983) On glutamine synthetase, carbonic anhydrase and Müller glia in the retina. En: *Progress in retinal research.* Pergamon Press. Oxford. 111-135 pp.
- Nelson, N. (1992) Organellar proton-ATPases. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 4: 654-660.
- Nelson, N. y Lill, H. (1994) Porters and neurotransmitter transporters. *J. exp. Biol.*, 196: 213-228.
- Newman, E. A. (1985) Voltage-dependent calcium and potassium channels in retinal glial cells. *Nature*, 317:809-811.
- Newman, E. A. (1987) Distribution of potassium conductance in mammalian Müller (glial) cells: a comparative study. *J. Neurosci.*, 5(8):2423-2432.
- Nicholls, D. G. (1994) *Proteins, Transmitters and Synapses.* Blackwell Scientific Publications. Oxford. 253 pp.
- Nicholls, J. G., A. R. Martin y B. G. Wallace (1992) *From Neuron to Brain.* Third edition. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, USA. 807 pp.
- Orkand, R. K., J. G. Nicholls y S. W. Kuffler (1966) Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J. Neurophysiol.*, 29:788-806.
- Pasantes-Morales, H., J. Kleithi, P. F. Urban y P. Mandel (1972) The physiological role of taurine in retina. *Brain Res.*, 41:494-497.
- Rasmussen, K. E. (1974) The Müller cell: a comparative study of rod and cone retinas with and without retinal vessels. *Exp. Eye Res.*, 19:243-257.
- Ripps, H. y P. Witkovsky (1985) Neuron-glia interaction in the brain and retina. En: *Progress in retinal research.* Pergamon Press. Oxford. 181-219 pp.

- Robinson, S. R. y Z. Dreher (1990) Müller cells in adult rabbit retinae: Morphology, distribution and implications for function and development. *J. Comparative Neurology*, 292:178-192.
- Schnapf, J. L. y D. A. Baylor (1987) How photoreceptor cells respond to light. *Sci. Am.*, 256(4):40-47.
- Shepherd, G. M. (1974) *The Synaptic Organization of the Brain. An Introduction.* Oxford University Press. New York, USA. 364 pp.
- Siliprandi, R., R. Canella, G. Carmignoto, N. Schiavo, A. Zanellato, R. Zanoni y G. Vantini (1992) N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the adult retina. *Visual Neurosci.*, 8:567-573.
- Smith, K. E., Borden, L. A., Hartig, P. A., Branchek, T. y Weinschank, R. L. (1992) Cloning and expression of a glycine transporter reveal colocalization with NMDA receptors. *Neuron*, 8: 927-936.
- Somohano, F. y A. M. López-Colomé (1991) Characteristics of excitatory amino acid uptake in cultures from neurons and glia from the retina. *J. Neurosci. Res.*, 28:556-562.
- Swartz, K. J., J. B. Martin y M. F. Beal (1988) Glycine potentiates NMDA receptor mediated quinolinic acid neurotoxicity in rat striatum. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 14:97.
- Szatkowsky, M., B. Barbour y D. Attwell (1990) Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reverse electrogenic glutamate uptake. *Nature*, 348:443-446.
- Uhl, G. R. y Hartig, P. R. (1992) Transporter explosion: update on uptake. *Trends Neurosci.*, 13: 421-425.
- Uhl, G. R. y Johnson, P. S. (1994) Neurotransmitter transporters: three important gene families for neuronal function. *J. exp. Biol.*, 196: 229-236.
- Virgo, L. y Belleruche, J. (1995) Induction of the immediate early gene *cjun* in human spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis with concomitant loss of NMDA receptor NR1 and glycine transporter mRNA. *Brain Res.*, 676: 196-204.
- Wassle, H. y B. B. Boycott (1991) Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol. Rev.*, 71(2):447-480.
- Wheater, P. R., H. G. Burkitt y V. G. Daniels (1987) *Functional Histology.* Churchill Livingstone, London. 348 pp.

Zafra, F. y C. Giménez (1986) Characterization of glycine uptake in plasma membrane vesicles isolated from cultured glioblastoma cells. *Brain Res.*, 397:108-116.

Zafra, F. y C. Giménez (1989) Characteristics and adaptive regulation of glycine transport in cultured glial cells. *Biochem. J.*, 258:403-408.

Zafra, F., C. Aragón, L. Olivares, N. C. Danbolt, C. Giménez y J. Storm-Mathisen (1995) Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J. Neurosci.*, 15(5): 3952-3969.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**